

**Evolute Biotechnologie und
Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie:**
Systeme zur Änderung enzymatischer Substratspezifität
und Auffindung neuer Wirkstoffe

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zu Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl. Biochem. Michael Jahnz

aus Porta Westfalica

geboren am 13. November 1972 in Bückeburg

2003

Referent: Prof. Dr. Jürgen Alves

Korreferentin: Prof. Dr. Petra Schwille

Tag der Promotion: 26. Mai 2003

vollständige Liste der Publikationen von M. Jahnz

- (I.) V. V. Vaidyanathan, K. Yoshino, M. Jahnz, C. Dörries, S. Bade, S. Nauenburg, H. Niemann, and T. Binz, *Proteolysis of SNAP-25 isoforms by botulinum neurotoxin types A, C, and E: domains and amino acid residues controlling the formation of enzyme-substrate complexes and cleavage*, Journal of Neurochemistry **72** (1999), no. 1, 327–337.
- (II.) F. Malvezzi-Campeggi, M. Jahnz, K.G. Heinze, P. Dittrich, and P. Schwille, *Light-Induced Flickering of DsRed Provides Evidence for Distinct and Interconvertible Fluorescent States*, Biophysical Journal **81** (2001), no. 3, 1776–1785.
- (III.) P. Dittrich, F. Malvezzi-Campeggi, M. Jahnz, and P. Schwille, *Accessing molecular dynamics in cells by fluorescence correlation spectroscopy*, Biological Chemistry **382** (2001), no. 3, 491–494.
- (IV.) K. G. Heinze, M. Rarbach, M. Jahnz, and P. Schwille, *Two-photon fluorescence coincidence analysis: Rapid measurements of enzyme kinetics*, Biophysical Journal **83** (2002), no. 3, 1671–1681.
- (V.) E. Haustein, M. Jahnz, and P. Schwille, *Triple FRET - A tool for studying long-range molecular interactions*, ChemPhysChem (2003) (im Druck)

keywords:

evolutionary biotechnology; fluorescence-correlation-spectroscopy; FLP-recombinase

Schlagworte:

evolutive Biotechnology; Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie; FLP-Rekombinase

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	7
2	Einleitung	9
2.1	Die Suche nach neuen biomolekularen Funktionen	9
2.2	Zielsetzung	10
3	Evolute Biotechnologie	12
3.1	Von der biochemischen Forschung zur technischen Anwendung . .	12
3.2	Molekulare Funktionen nach Wunsch	12
3.3	Evolute Biotechnologie	16
3.4	Wirkstoffsuche für die Pharmakologie	21
4	Einführung in die FCS	23
4.1	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)	23
4.2	Theorie der Zweifarben-FCS	26
4.3	Das kommerzielle ConfoCor2-Instrument	29
4.4	Messung und Auswertung	31
5	Material und Methoden	36
5.1	Materialien	36
5.2	Molekularbiologische Methoden	45
5.3	Arbeit mit Mikroorganismen	49
5.4	Protein-biochemische Methoden	50
5.5	In vitro Translation	53
5.6	Emulsionen	54
6	Projekt A: FLP-Rekombinase	57
6.1	Eigenschaften der FLP-Rekombinase	59
6.2	Gewinnung von FLP	61
6.3	Messprinzipien zur Beobachtung von DNA-Rekombination mit Zweifarben-FCS	69
6.4	Messergebnisse zur FLP-Rekombination im ConfoCor2	75
6.5	Einsatz von FRET zur Beobachtung von Rekombination	83
6.6	Entwicklung eines <i>in vitro</i> Selektionssystems für FLP	88
7	Projekt B: Topoisomerase II	106

INHALTSVERZEICHNIS

7.1	Eigenschaften von Topoisomerase II und ihrer Inhibitoren	107
7.2	Konzept des Topoisomerase II Inhibitionsassays für die Zweifarb-FCS	109
7.3	Messergebnisse zur Unterscheidung verschiedener Topoisomerase-II Inhibitoren durch Zweifarben-FCS	111
8	Ergebniszusammenfassung, Diskussion und Ausblick	116
8.1	Assay-Entwicklung für FLP-Rekombinase – Basis für Selektion durch Screening	116
8.2	FLP in Emulsionen: Selektion durch Genotyp-Phänotyp-Kopplung	119
8.3	Topoisomerase II: Etablierung eines Zweifarben-FCS Assays zur Entdeckung und Klassifizierung neuer Inhibitoren	121
8.4	Ausblick	121
	Literaturverzeichnis	123
	Abkürzungsverzeichnis	135
	Sequenzen	136
	Danksagung	141
	Curriculum vitae	143

1 Zusammenfassung

Die **evolutive Biotechnologie** wendet natürliche Prinzipien der Evolution zur Veränderung der Eigenschaften von Biomolekülen an. Für die Beobachtung biochemischer Reaktionen bietet die **Zweifarben-Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie** (Zweifarben-FCS) als Einzelmolekül-sensitive Detektionsmethode ein großes Potenzial. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Applikation dieser beiden Methoden zur gerichteten Veränderung der Substratspezifität der FLP DNA-Rekombinase einerseits, und zur Auffindung und Charakterisierung von Inhibitoren der Topoisomerase II andererseits.

Als biochemisches Modellsystem zur DNA-Rekombination wurde die **FLP-Rekombinase** verwendet, welche eine spezifische DNA-Sequenz erkennt. Für dieses Enzym wurde zunächst ein auf Zweifarben-FCS basierendes Rekombinations-Assay entwickelt, das es erlaubt, verschiedene Rekombinationsbedingungen zu untersuchen und FLP-Varianten in ihrer Aktivität untereinander zu vergleichen. FLP katalysierte Rekombination konnte mit dem neuen System erfolgreich durch Zweifarben-FCS nachgewiesen werden. Mit Verfügbarkeit dieses Assays kann die Zweifarben-FCS für eine Selektion durch Screening bei der evolutiven Veränderung der FLP-Rekombinase eingesetzt werden.

Alternativ zur Selektion durch Screening wurde ein eigenständiger evolutiver Prozess für die Veränderung der FLP-Substratspezifität entwickelt, dessen Selektion auf Genotyp-Phänotyp-Kopplung und Amplifikation durch PCR basiert. Die Funktionsfähigkeit dieses neuen Systems konnte über die eindeutige Unterscheidung der wtFLP von inaktiven FLP-Varianten gezeigt werden. Durch den Einsatz von Wasser-in-Öl-Emulsionen zur Kompartimentierung und zellfreier Translation zur Expression laufen alle Schritte dieses Systems *in vitro* ab. Sowohl für das Zweifarben-FCS Assay als auch für den evolutiven Prozess gilt, dass wegen des modularen Aufbaus die Übertragbarkeit auf andere Rekombinasen möglich ist.

Als weiteres biochemisches System wurden die Hemmung der DNA-**Topoisomerase II** untersucht. Zur Charakterisierung von Inhibitoren dieses Enzyms wurde ein geeignetes Konzept für die Zweifarben-FCS entworfen und experimentell umgesetzt. Inhibitoren der Topoisomerase II stellen wichtige Substanzen in der Tumorbehandlung dar, wobei es auf eine Unterscheidung von verschiedenen Substanzklassen ankommt. Das entwickelte Assay konnte mit bekannten Inhibitoren verschiedener Klassen erfolgreich überprüft werden. Mit der Etablierung dieses Systems eröffnet sich die Möglichkeit, Zweifarben-FCS zur schnellen Auffindung *und Klassifizierung* neuer Topoisomerase II Inhibitoren einzusetzen. Auch hier ist eine Übertragbarkeit auf andere Topoisomerasen ohne weiteres möglich.

abstract

Evolutionary biotechnology applies the natural principles of evolution to change the properties of biomolecules. **Dual-color fluorescence-cross-correlation-spectroscopy** (DC-FCS) is a single-molecule-sensitive method to detect fluorescently labeled biomolecules and their reactions. The aim of the present work was the combination of both methods to (1) change substrate-specificity of FLP-recombinase, and (2) identify and classify new inhibitors of topoisomerase II.

For experiments of the first project, the site-specific **FLP-recombinase** served as a biochemical model system for DNA recombination. A DC-FCS based assay was developed to compare different FLP variants in activity and specificity. The new system succeeded in measuring FLP catalyzed recombination *in vitro* using DC-FCS. The availability of this assay is a prerequisite for applying DC-FCS as a screening method in selection of evolved FLP-variants.

The alternative system invented to change the substrate-specificity of FLP is not dependent on selection by screening. This evolutionary cycle-process is based on selection by genotype-phenotype-coupling and subsequent amplification of positive variants with PCR. The whole system was shown to be functional when distinguishing active from inactive FLP-mutants. Components of the system include compartmentalization by water-in-oil-emulsions and cell-free translation allowing the change of FLP-substrate-specificity *in vitro*. Due to the modular design, both the DC-FCS assay and the cycle-process can easily be modified to be used for other recombinases than FLP.

The second project consisted in applying DC-FCS for the detection **topoisomerase II** inhibitors. For this goal, an appropriate assay was developed. Inhibitors of topoisomerase II are valuable candidates in anti-cancer therapy. According to their pharmacological effects, the compounds can be divided in two distinct classes. The assay presented in this work could unequivocally distinguish between the two types, thus giving essential information about potential drug candidates. The principle of the assay can easily be transferred to investigate many other topoisomerases. In summary, the new system provides an important step towards using DC-FCS in high-throughput drug screening applications.

2 Einleitung

2.1 Die Suche nach neuen biomolekularen Funktionen

In den letzten Jahrzehnten hat eine rasante Entwicklung in der Entschlüsselung von Nukleinsäure- und Proteinsequenzen sowie Aufklärung von biologischen Strukturen eingesetzt. Dadurch steht heute ein enormer Datenbestand zur Verfügung, der Aufschluss über viele biochemische Details von natürlichen Prozessen gibt. Diese Daten dienen oftmals der Beschreibung biomolekularer Funktionen und Lösungen, die die Natur zur Bewältigung spezieller, z.B. katalytischer Probleme hervorgebracht hat. Neben einer reinen Beschreibung bestand aber schon früh der Wunsch, natürliche Problemlösungen für technische oder medizinische Zwecke nutzbar zu machen. Im technischen Bereich wird diese Disziplin oft auch als *Bionik* bezeichnet und zielt darauf ab, Lösungen zu konstruieren, die natürlichen Beispielen analog sind [123]. Auch auf molekularer Ebene ist eine solche Übertragung aus der Natur auf spezielle pharmazeutische oder technische Fragestellungen sinnvoll.

Stehen für eine gegebene biomolekulare Anwendung geeignete natürliche Biomoleküle nicht zur Verfügung, so kann eine Anpassung ähnlicher Moleküle durch schrittweise Veränderung vorgenommen werden, um so Funktionen nach Bedarf zu generieren. Dieses Prinzip der Adaption entspricht genau dem Hauptcharakteristikum aller lebender Systeme: **Evolution**.

Prägend für die Bedeutung der Evolution ist das berühmte Zitat: „*Nothing in biology makes sense except in the light of evolution – Nichts in der Biologie macht Sinn, außer man betrachtet es im Licht der Evolution*“ [26]. Die Grundprinzipien der Evolution: *Variation*, *Selektion* und *Amplifikation* wurden durch verschiedene Wissenschaftler auf künstliche Systeme übertragen [75]. So werden in der Literatur eine Reihe von Evolutionsexperimenten beschrieben, die zeigen, dass im Labor eine gerichtete Adaption von Moleküleigenschaften an vorgegebene Anforderungen möglich ist. Diese als **evolutive Biotechnologie** bezeichnete Disziplin ermöglicht die gezielte Erzeugung von Biomolekülen mit definierten, gewünschten Eigenschaften. Evolutionsexperimente zur Veränderung einer DNA-Rekombinase bildeten einen Schwerpunkt dieser Arbeit.

Für die *Selektion* durch Screening innerhalb von Evolutionsexperimenten ist die Leistung der eingesetzten Analysemethode von entscheidender Bedeutung. Auch für das Durchmustern von Substanz-Bibliotheken auf mögliche Kandidaten für pharmazeutische Anwendungen hin (*drug-screening*) werden neue universell einsetzbare Detektionstechnologien benötigt. Die bisher entwickelten biochemischen Methoden genügen dabei nicht immer den Ansprüchen an hohem Probendurchsatz oder Sensitivität. Zur Steigerung der Effizienz sowie der Geschwindigkeit bei der Suche nach neuen biomolekularen Funktionen

2. EINLEITUNG

werden daher verstärkt auch moderne biophysikalische Messtechniken mit einbezogen.

Als eine wichtige solche Methode gilt die **Zweifarbigen Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie** (fluorescence-crosscorrelation-spectroscopy, FCS), welche vor wenigen Jahren erstmals experimentell realisiert wurde [95, 99]. Durch das Prinzip der Messung, die Assoziation oder Dissoziation zweier unterschiedlicher Fluoreszenzmarker zu analysieren, ergibt sich ein sehr großes Anwendungspotenzial in der Detektion von biochemischen Reaktionen [46]. Die Zweifarben-FCS benötigt kurze Messzeiten und besitzt **Einzelmolekül-Sensitivität**, was diese Technik geradezu ideal für die Applikation in der evolutiven Biotechnologie und im *drug-screening*-Bereich macht. Die dazu erforderliche Assay-Entwicklung war ein weiterer Schwerpunkt der hier durchgeführten Experimente.

2.2 Zielsetzung

Die Zielsetzung dieser Arbeit beinhaltet zwei Aspekte:

- Die spezifische Rekombination von DNA ist ein wichtiges molekularbiologisches Werkzeug für die Manipulation größerer Genabschnitte. Ziel der Arbeiten hier war es, evolutive Systeme zu entwickeln, die die Veränderung der Substratspezifität von FLP-Rekombinase ermöglichen. Eine Teilabsicht dieses Vorhabens war der Aufbau entsprechender Assays zur Messung von DNA-Rekombination mittels Zweifarben-FCS, um diese Technik als Screening-Methode in der evolutiven Selektion einsetzen zu können. Hauptziel war die Etablierung eines gesamten Prozesses zur gerichteten Evolution von FLP mit einer auf Genotyp-Phänotyp-Kopplung basierenden Selektion.
- Ein wichtiger Ansatzpunkt zur Behandlung von Tumoren stellt die Hemmung der DNA-Topoisomerase II dar. Ziel der Arbeiten hier war die Entwicklung und Überprüfung eines Topoisomerase II Inhibitions-Assays für die Zweifarben-FCS. Dahinter stand die Absicht, diese Technik für die schnelle Identifizierung und Charakterisierung neuer Topoisomerase II Inhibitoren nutzen zu können.

Der Aufbau der Arbeit gliedert sich wie folgt:

Das **Kapitel 3** führt in die Ansätze zur Generierung neuer Biomoleküle ein. Es wird ein Überblick über Prinzipien der Evolution und die sich daraus ergebende evolutive Biotechnologie gegeben. Auch wird in diesem Abschnitt auf die pharmazeutische Bedeutung der Auffindung neuer Substanzen sowie entsprechende Selektionsstrategien eingegangen. Das **Kapitel 4** stellt die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie als biophysikalische

Messmethode vor. Dort werden die theoretischen Grundlagen der Fluktuationsanalyse beschrieben und mathematische Auswertemodelle für Auto- und Kreuzkorrelationsanalysen vorgestellt. Zentraler Bestandteil dieses Kapitels ist weiterhin die Darstellung des Messprinzips mit schematischem Versuchsaufbau und Beschreibung des verwendeten ConfoCor2-Gerätes. Der Ablauf von Messungen und der generelle Auswertungsprozess sind ebenfalls Teil des Abschnitts.

Das **Kapitel 5** listet die verwendeten Materialien, Chemikalien, Mikroorganismen und Geräte auf. Dieses Kapitel gibt außerdem Aufschluss über alle eingesetzten biochemischen Arbeitsmethoden.

Im **Kapitel 6** (Projekt A) werden die Ergebnisse und Experimente zur Veränderung der **FLP-Rekombinase** vorgestellt. Dieses Kapitel beschreibt die beiden Strategien, die dabei verfolgt wurden:

- Thema des ersten Teils ist die Assay-Entwicklung zur Messung von DNA-Rekombination mittels Zweifarben-FCS und anderen Fluoreszenzmethoden. Die prinzipiellen Möglichkeiten sowie Messungen und Resultate werden in diesem Punkt detailliert erläutert.
- Der zweite Teil zeigt das evolutive Gesamtsystem, welches zur Veränderung von FLP entwickelt wurde. Die Versuche und Ergebnisse zu den einzelnen Komponenten wie zellfreie Expression, Kompartimentierung durch Wasser-in-Öl Emulsionen und Genotyp-Phänotyp-Kopplung sind ebenso Gegenstand dieses Abschnitts, wie die Erprobung des gesamten Systems.

Das **Kapitel 7** (Projekt B) beschäftigt sich mit der **DNA-Topoisomerase-II** und ihren Inhibitoren. Das hier entwickelte Assay für die Zweifarben-FCS wird vorgestellt und Experimente und Ergebnisse gezeigt, die mit verschiedenen Inhibitoren erzielt werden konnten.

Im **Kapitel 8** schließlich erfolgt die Zusammenfassung und Beurteilung der erhaltenen Ergebnisse. In diesem Abschnitt wird auch ein kurzer Ausblick auf weiterführende Arbeiten gegeben.

3 Evolutive Biotechnologie

3.1 Von der biochemischen Forschung zur technischen Anwendung

Die biochemischen und biotechnologischen Entwicklungen der letzten 30 Jahre haben erheblich zu einem besseren Verständnis der molekularen Zusammenhänge im biologischen, medizinischen und pharmazeutischen Bereich beigetragen. Zunächst konnten nur die in der Natur in großen Mengen vorkommenden Biomoleküle isoliert, gereinigt und untersucht werden. Die dafür notwendigen Techniken wie z.B. Säulenchromatographie waren schon früh entwickelt. Der eigentliche Durchbruch in der Erforschung molekularer Funktionen begann mit der Entwicklung der *in vitro* Rekombination von DNA [19, 50]. Die dadurch entstandenen Methoden der Gentechnik erlauben es, eine Vielzahl von Proteinen unabhängig von ihrer natürlichen Quelle zu gewinnen und zu charakterisieren. Zusätzlich können durch konsequente Anwendung und Weiterentwicklung von Methoden zur Strukturaufklärung immer genauere Kenntnisse über die einzelnen Biomoleküle und die Mechanismen ihrer Wechselwirkungen untereinander gewonnen werden. Aufgrund der hohen Komplexität ist der Struktur- und Funktionssektor (Proteomik) der modernen Biologie bis heute jedoch noch nicht zu einem zufrieden stellenden Grad erforscht. Im Gegensatz dazu sind die Arbeiten auf dem Gebiet der Genomik so weit fortgeschritten, dass wir uns – nach Durchsequenzierung der Genome etlicher Organismen (u.a. Mensch [114], Maus [120], *Drosophila* [1], *E.Coli* [13]) – in der so genannten *post-genomischen* Ära befinden. Die Aufklärung von molekularen Mechanismen erfolgte schon immer nicht nur aus reiner Neugier, sondern hatte durchaus praktischen, oft auch wirtschaftlichen Nutzen im Sinn. Es wurde schon früh versucht, die gewonnenen Erkenntnisse auszuwerten, um Fortschritte vor allem im medizinischen und pharmazeutischen Bereich zu machen. Es gibt etliche Beispiele für pharmakologische, diagnostische oder technische Anwendung von in der Natur entdeckten Biomolekülen. Besonders Peptide und Proteine, aber auch viele andere komplexe natürliche Substanzen, die durch chemische Synthesemethoden nicht darstellbar sind, werden heute in großen Mengen hergestellt. Grundlage für diese qualitativ hochwertige Produktion von Biomolekülen ist die Biotechnologie, welche durch ihre Fermentations- und Kulturtechniken im Prinzip die vorhandenen gentechnischen Methoden vom Labor- zum Produktionsmaßstab hochskalieren konnte.

3.2 Molekulare Funktionen nach Wunsch

Der schnelle Wissenszuwachs auf den biochemisch-biotechnologischen Gebieten führt unmittelbar zu einer großen Nachfrage nach maßgeschneiderten Biomolekülen. Die Bezeichnung *maßgeschneidert* reflektiert dabei den Wunsch, in den Besitz neuer Moleküle mit

ganz speziellen, genau definierten Eigenschaften zu gelangen. Dabei kann es einerseits darum gehen, in der Natur vorhandene Moleküleigenschaften verbessern zu wollen, andererseits werden oft auch Substanzen benötigt, die so in der Natur nicht gefunden werden konnten. Die nachstehende Auflistung gibt eine Übersicht über die prinzipiellen Eigenschaften von Biomolekülen und deren Anwendungspotenziale:

- **Bindende Moleküle** können in drei Klassen eingeteilt werden:
 - Zu den Molekülen, bei denen die spezifische, **reine Bindung** im Vordergrund steht, gehören vor allem Antikörper, viele Peptide, Aptamere und andere kleinere Moleküle wie Biotin. Diese Eigenschaft ist z.B. in der Diagnostik wichtig, aber auch in der Forschung kann sie zur Affinitätschromatographie, Detektion sowie Markierung von anderen Biomolekülen eingesetzt werden.
 - Eine weitere Klasse stellen Substanzen dar, die durch ihre spezifische **Bindung** zur **Regulation** von Prozessen beitragen. Beispiele hierfür sind Inhibitoren und Aktivatoren, sowie Rezeptorliganden. Die Anwendungen sind hier ganz eindeutig pharmazeutisch, da sich durch die gezielte Blockierung bzw. Steuerung von zellulären Abläufen enorme therapeutische Möglichkeiten ergeben.
 - Das große Gebiet der Katalyse schließlich beschreibt den **chemischen Umsatz des Substrates nach Bindung**. Die Generierung neuer Biokatalysatoren ist besonders in der chemischen und biochemischen Forschung und Industrie von Bedeutung, aber auch z.B. im Umweltbereich und im Haushalt.
- Daneben existieren auch Moleküle, die im Prinzip **keine Interaktion** mit Partnern eingehen. Dazu zählen z.B. autofluoreszierende Proteine, welche als Reportersystem oder zur Fluoreszenzmarkierung verwendet werden können.

Für die drei verschiedenen Klassen bindender Moleküle steht die Veränderung der Parameter *Affinität*, *Spezifität* und *Aktivität* im Mittelpunkt des Interesses. Die Auffindung von neuen Inhibitoren sowie die Veränderung der Spezifität katalytischer Umsetzungen bilden jeweils Teilschwerpunkte dieser Arbeit.

Die Nachfrage nach neuen Katalysatoren, Wirkstoffen und anderen Biomolekülen überspannt neben den oben genannten etliche weitere Disziplinen der Wissenschaft und Technik. Daraus ergibt sich ein enormes wirtschaftliches Potenzial, wenn es gelingt, den individuellen Nachfragen zeitnah gerecht zu werden. So stellt die Entwicklung von Methoden zum flexiblen Design neuer Biomoleküle einen aktuellen Forschungsschwerpunkt in der Biotechnologie dar. Der Übergang von der Untersuchung und Nutzung von *in der Natur vorkommenden* Molekülen hin zur *gezielten Erzeugung* technisch und pharmazeutisch nutzbarer Moleküle kennzeichnet den Umbruch, in dem sich die moderne Biotechnologie

3. EVOLUTIVE BIOTECHNOLOGIE

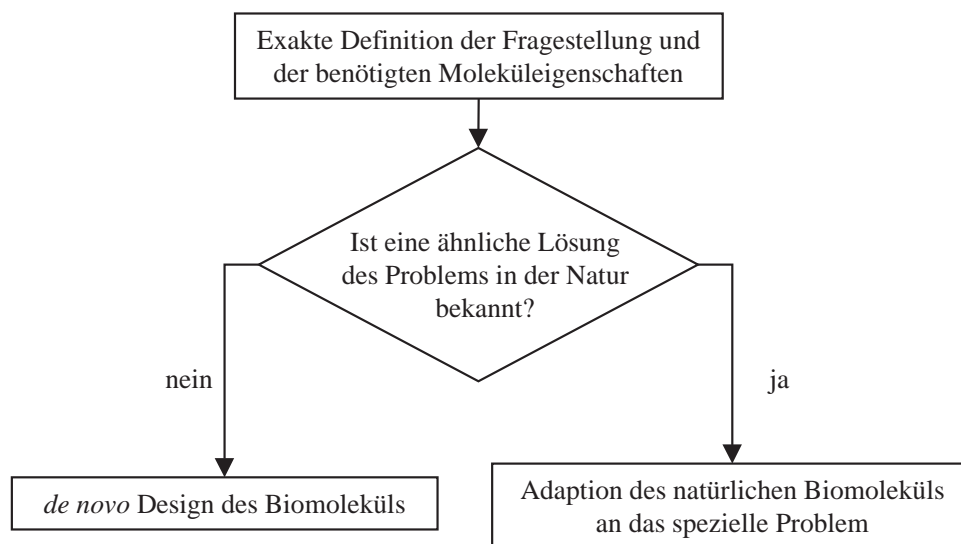


Abbildung 1: Der Weg zum Molekül nach Maß

Der abgebildete Entscheidungsprozess ist gleichzeitig auch eine Wiedergabe der historischen Entwicklung der biochemischen Forschung: Bestimmte Molekülfunktionen wurden schon früh gewünscht und konnten zwar exakt definiert, aber nicht realisiert werden (oben). Der Wissensstand um die molekularen Zusammenhänge in der Natur hat sich erst in jüngster Zeit extrem verbessert (Mitte). Die Methodenentwicklung zum Design/Adaption von Biomolekülen schließlich hat ihren Höhepunkt noch vor sich (unten).

zur Zeit befindet [37].

Liegt eine spezielle Fragestellung vor, so muss diese exakt definiert und dann analysiert werden, ob eine ähnliche Lösung des Problems in der Natur bereits realisiert wurde (Abb. 1). Je nachdem, ob eine völlige Neuentwicklung (*de novo*) der gewünschten molekularen Funktion notwendig ist, oder vorhandene Funktionen adaptiert werden können, kommen dann verschiedene Ansätze aus dem Bereich der Bioinformatik und Biotechnologie zur Anwendung, die im Folgenden eingehender beschrieben werden.

3.2.1 Einsatz von Computern

Durch die zunehmende Geschwindigkeit der biochemischen Forschung und Entdeckung werden immer mehr molekulare Funktionen aufgeklärt. Trotz der enormen Datenfülle ermöglichen es die heute aufgebauten Datenbanken, die bereits erlangten Erkenntnisse sehr effizient zu durchsuchen und auszuwerten. Dieses mit dem Begriff *data mining* bezeichnete Vorgehen wurde durch die Verfügbarkeit von genomischen Sequenzdaten stark vorangetrieben. Dabei wird versucht, z.B. anhand von Strukturmotiven *Vorhersagen* für

bislang nicht experimentell belegte Funktionen zu treffen. So erscheint es möglich, weitere Funktionen in der Natur allein durch die Analyse von Daten zu entdecken.

Während die Verarbeitung der bisher gewonnenen Daten sehr gut funktioniert und zu einem wertvollen Bestandteil der Forschung geworden ist, sieht es im Bereich des *de novo* Moleküldesigns ganz anders aus. Für kleinere Moleküle konnten bisher zwar erfolgreich Berechnungen und Simulationen vorgenommen werden [77, 80], aber die extreme Komplexität von Proteinen ist auch durch leistungsstarke Rechner technisch nicht beherrschbar. Besonders die enorm vielen Freiheitsgrade bereiten massive Probleme in Bezug auf Rechenzeiten. Berücksichtigt man noch *dynamische* Effekte von Proteindomänen, so ist eine computergestützte Vorhersage von Strukturen kaum noch verlässlich möglich.

3.2.2 *de novo* Moleküldesign

Die anspruchsvollste und schwierigste Methode, neue Funktionen zu generieren, besteht im *de novo* Design von Proteinen. Dabei bezieht sich der Ausdruck *de novo* auf den Ausgangspunkt der Strategie: ein völlig randomisierter Genotyp ohne nennenswerte Sequenzähnlichkeit zu bekannten in der Natur vorkommenden Lösungen wird als Grundlage für die Entwicklung des Proteins verwendet. Dadurch werden die Freiheitsgrade maximal gehalten, was zu einem hohen Potenzial führt, zur gewünschten Funktion zu kommen. Für kleine Moleküle konnten mit dieser Strategie auch schon Erfolge erzielt werden, jedoch stößt man bei größeren Proteinen schnell an die durch die hohe Komplexität vorgegebenen Grenzen [20].

Eine interessante Möglichkeit, bisher in der Natur nicht realisierte katalytische Aktivitäten *de novo* zu generieren bietet das Konzept der katalytischen Antikörper [56, 61, 81, 108]. Dabei erfolgt die Immunisierung von Tieren mit einem Übergangszustand-Analogen der gewünschten Reaktion. Die gebildeten Antikörper sind im Prinzip nur auf Bindung dieses Übergangszustandes ausgerichtet, zeigen dann oft aber auch die gewünschte katalytische Aktivität, wenngleich zunächst in sehr geringen Effizienzen. Strukturbezogenes *de novo* Design durch Kombination von Sekundärstruktur-Elementen führt ebenfalls zunächst über reine Bindung schließlich zu neuen katalytischen Aktivitäten [71]. Insgesamt bieten *de novo* Entwicklung zwar die universellste Möglichkeit, individuelle Probleme zu lösen, haben experimentell jedoch immer die gravierende Schwierigkeit der extrem hohen Komplexität (vgl. auch Abschnitt 3.3.2).

3.2.3 Adaption natürlicher Biomoleküle

Ist für eine spezielle Fragestellung eine sehr ähnliche Lösung bereits in der Natur durch ein Biomolekül realisiert, so kann versucht werden, dieses Biomolekül an das spezielle Problem zu adaptieren. Eine häufig vorkommende technische Fragestellung ist z.B. die enzymatische Katalyse bei höheren Temperaturen oder in anderen Lösungsmitteln als

3. EVOLUTIVE BIOTECHNOLOGIE

Wasser. Gibt es ein natürliches Pendant passender Spezifität, so muss die Thermostabilität oder die Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln erhöht werden. Andere Fragestellungen betreffen wiederum die Spezifität von Enzymen wie z.B. Nukleasen, Rekombinasen oder Proteasen – hier besteht oft Bedarf, bekannte Spezifitäten zu verändern oder zu erweitern.

Wie können solche Adaptionen jedoch realisiert werden?

Ein bislang häufig genutzter Ansatz ist das *rationale Design*. Dabei geht es um den Versuch, neue Enzym-Eigenschaften durch den Austausch einzelner Aminosäuren gezielt zu erzeugen. Obwohl es etliche Beispiele für die erfolgreiche Umsetzung dieses Konzeptes gibt, bestehen doch einige gravierende Nachteile. Ein Problem ist die schnell steigende Komplexität, wenn mehr als eine Mutation eingeführt werden muss, um zum Ziel zu gelangen – vor allem bei Kombinationen von mehreren Punktmutationen ergibt sich eine große Anzahl von Möglichkeiten. Die Arbeitsweise der rationalen Molekülgestaltung ist aufwändig und langsam, da die Mutanten erst erzeugt, exprimiert und gereinigt werden müssen, bevor die erhoffte Eigenschaft experimentell überprüft werden kann. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass relativ viele, insbesondere Strukturinformationen über das Molekül bekannt sein müssen, damit überhaupt eine Aussicht auf Erfolg besteht.

Eine elegantere Möglichkeit der schrittweisen Adaption von Biomolekülen an neue Funktionen bietet die Anwendung von natürlichen evolutiven Prinzipien und entsprechende Umsetzung in der Biotechnologie.

3.3 Evolutive Biotechnologie

Der Begriff *evolutive Biotechnologie* bezeichnet die Anwendung der natürlichen Evolutionsprinzipien auf die Biotechnologie, mit dem Ziel des gerichteten Designs neuer Biomoleküle [29]. Schwerpunkte bilden dabei die Nukleinsäuren und Proteine mit ihren katalytischen Eigenschaften. Zum Einsatz kommen verschiedene *in vitro* und *in vivo* Strategien [58, 62, 82], die sich vor allem am speziellen zu lösenden Problem orientieren.

3.3.1 Natürliche Prinzipien der Evolution

Bereits während einer fünfjährigen Weltreise in den Jahren 1831-1836 bekam Charles Darwin reichlich Anregungen für seine später herausgebrachte Selektionstheorie [21]. Danach sind alle Lebewesen einem andauernden Wettbewerb ausgesetzt, den nur die Tauglichsten überleben (*survival of the fittest*). Mit weiter fortschreitender Forschung konnten Darwins Überlegungen später durch die Populationsgenetik und schließlich die Molekularbiologie bestätigt und ausgebaut werden zu einer allgemeinen Evolutionstheorie.

Absolute Voraussetzung für evolutive Entwicklung ist zunächst die Schaffung neuer Eigenschaften durch zufällige **Variation**. Aus der Menge der neuen Phänotypen werden

3. EVOLUTIVE BIOTECHNOLOGIE

dann die am besten angepassten **selektiert** bzw. wenig geeignete eliminiert. Die so angereicherten, besser adaptierten Individuen werden **vermehrt** und deren Genotypen miteinander **rekombiniert**. Dieser Prozess führt in einem Zyklus Schritt für Schritt näher an Problemlösungen heran. Diese Prinzipien der Evolution sind für ganze Populationen

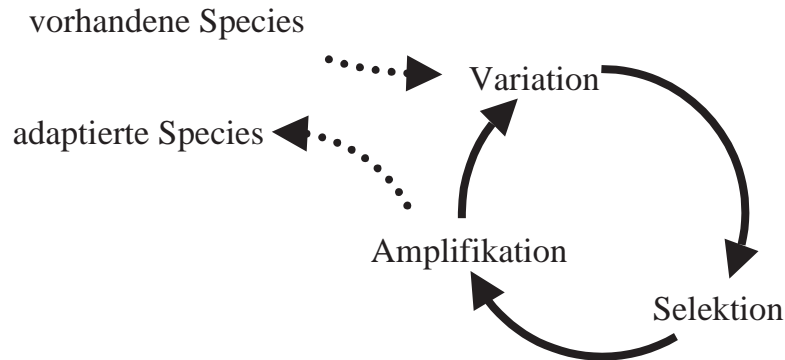


Abbildung 2: *Das evolutive Prinzip*

ebenso gültig wie für einzelne Zellen, ja sogar bis hinab auf die Ebene einzelner Moleküle - eine Ebene auf welche sich auch die folgenden Ausführungen beziehen werden.

Auf Molekülebene erscheint es sinnvoll, zunächst klar zwischen **Information** und **Funktion** zu unterscheiden und diese Eigenschaften bestimmten Klassen von Makromolekülen zuzuordnen. Nukleinsäuren stellen die Basis für Codierung sowie Informationsspeicherung und -weitergabe dar. Als lineares, doppelsträngiges Heteropolymer mit definierten Basenpaarungen besitzt DNA eine weitgehend von der Sequenz unabhängige Doppelhelix-Struktur. Obwohl auch für DNA einige katalytische Funktionen gefunden wurden [14], stellt die RNA einen Sonderfall dar. Sie kann zusätzlich zur Informationsspeicherung vielerlei Strukturen ausbilden und damit auch etliche Funktionen, wie z.B. Bindung oder Katalyse ausüben [51]. Mit Hilfe von Proteinen jedoch wird bei den heutigen Lebewesen der weitaus größte und vor allem vielseitigste Bereich der biologischen Funktionen realisiert. Die Bewältigung der unterschiedlichsten Aufgaben hängt vor allem von der *Struktur* der Proteine ab – eine Eigenschaft, für die Proteine ein gegenüber den Nukleinsäuren extrem erhöhtes Variationspotenzial besitzen. Dies ist auch ein Grund dafür, dass als ursprüngliche Substanz die RNA sowohl für Informationsspeicherung als auch für Funktion gedient haben mag [30, 38], mit wachsender Genomgröße jedoch die Trennung in zwei Molekülklassen für Informationsspeicherung (DNA) und Funktionen (Proteine) erfolgte.

3. EVOLUTIVE BIOTECHNOLOGIE

3.3.2 Variationspotenzial und Variation

Sowohl Nukleinsäuren als auch Proteine besitzen zunächst auf Sequenzebene ein hohes Variationspotenzial. Gemäß der Beziehung

$$n = \mu^\nu \quad (1)$$

lässt sich leicht die Anzahl n verschiedener Sequenzmöglichkeiten berechnen, wenn die Sequenzlänge ν und die Anzahl der möglichen Bausteine μ pro Position ($\mu = 4$ für Nukleinsäuren und $\mu = 20$ für Proteine) bekannt sind. Betrachtet man z.B. eine DNA-Sequenz mit 400 bp, so gibt es $n = 4^{400}$ mögliche Sequenzen, was in etwa einer Zahl von $7 \cdot 10^{240}$ entspricht. Ein gleich langes Protein von 400 Aminosäuren Länge hätte hingegen ein Variationspotenzial von $n = 20^{400} = 3 \cdot 10^{520}$. Dies sind Zahlen, die die geschätzte¹ Anzahl der Atome im sichtbaren Weltall ($\approx 10^{79}$) um ein Vielfaches übersteigen. Die Erweiterung der Anzahl der Bausteine von 4 auf 20 erhöht also bereits deutlich die erreichbare Sequenzkomplexität. Macht man nun den Schritt von der Aminosäuresequenz hin zur Struktur, so muss die Anzahl der Sequenzmöglichkeiten noch mit der jeweiligen Anzahl der Freiheitsgrade pro Sequenz multipliziert werden. Damit ergeben sich nochmals wesentlich erweiterte Möglichkeiten durch den Einsatz von Proteinen für die Erfüllung von Funktionen. Wenn nun noch weitere Modifikationen wie z.B. Glykosylierungsmuster berücksichtigt werden, wird deutlich, welche extrem große Anzahl von Möglichkeiten in der Natur bereitsteht, um die verschiedensten biochemischen Probleme zu bewältigen.

Das hohe Variationspotenzial dient als Voraussetzung für die erfolgreiche Umsetzung evolutiver Strategien, bei der bestehende Lösungen verbessert werden sollen. Wie jedoch werden Variationen bestehender Sequenzen realisiert? Sowohl in der Natur, als auch im Experiment werden zufällige Veränderungen zunächst auf Nukleinsäure-Ebene ausgelöst, bevor sie sich im Protein auswirken. Im Organismus kann dies auf vielfältige Weise geschehen. Ein Beispiel sind spontane Mutationen, die durch ionisierende kosmische Strahlung, UV-Strahlung oder Einwirkung chemischer Substanzen entstehen. Ein weiterer, besonders wichtiger Punkt ist die ungenaue Replikation, wodurch statistisch Fehler auftreten. So ergibt sich innerhalb der Population eine dynamische Verteilung von Varianten mit ähnlichen Mutationen (*Quasispecies*-Konzept, Eigen, McCaskill und Schuster 1988 [28]). Prinzipiell gilt: mit steigender Fehlerrate steigt die Evolutionsgeschwindigkeit, wobei jedoch ein Maximalwert existiert. Oberhalb dieser „Fehlerschwelle“ zerfließt die Information vollständig [27]. Viele Viren mit kurzen RNA-Genomen replizieren in der Nähe dieser Fehlerschwelle und können so immerwährend dem Immunsystem der Wirte entgehen. Insgesamt sinkt mit steigender Genomgröße die Fehlerrate, was durch immer genauere Polymerasen mit Korrekturlesefunktion ermöglicht wird.

¹<http://www.sunspot.noao.edu/sunspot/pr/answerbook/universe.html#q70>

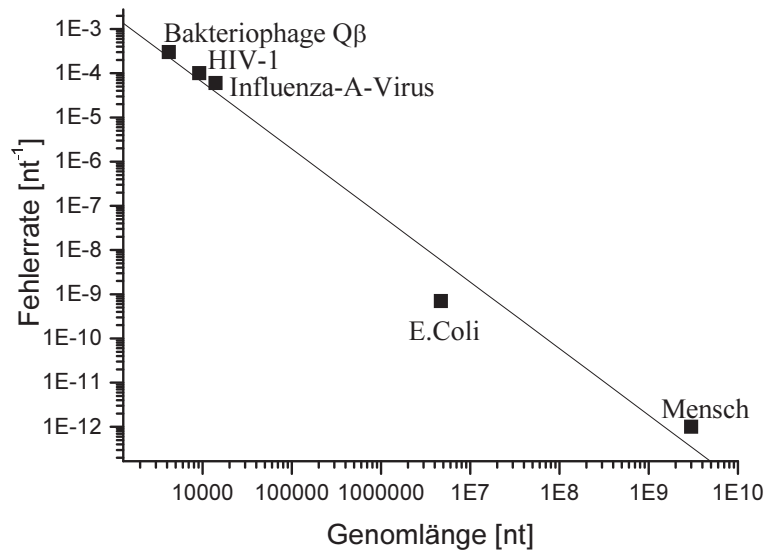


Abbildung 3: *Beziehung zwischen Genomgröße und Fehlerrate verschiedener Organismen*

3.3.3 Kompartimentierung

Für das Gelingen von evolutiven Strategien ist sowohl in der evolutiven Biotechnologie als auch in der Natur für jede einzelne Species die präzise Zuordnung von Phänotyp und Genotyp notwendig. Wird ein verbesserter Phänotyp selektiert, so muss die dazu passende Information amplifizierbar sein, um die Verbesserung propagieren zu können. In natürlichen Populationen stellen die individuellen Organismen räumliche Einheiten dar, innerhalb deren Grenzen Phänotyp und Genom eindeutig zugeordnet sind. Dies gilt bis hin zu den einzelligen Mikroorganismen die mit ihren Zellmembranen praktisch Biocontainer darstellen. Für gerichtete Evolutionsexperimente auf der Basis von Molekülen müssen ebenfalls Funktion und Information eindeutig zuordbar sein. Dafür stehen verschiedene Strategien zur Verfügung, von denen einige vorgestellt werden.

Zunächst einmal ist es naheliegend, die natürlichen Biocontainer, nämlich die Mikroorganismen, für die Kompartimentierung einer künstlichen erzeugten Bibliothek von DNA Mutanten heranzuziehen. Dabei erfolgt die Transformation der Organismen mit Methoden wie Elektroporation oder Hitzeschock. Obwohl die Verwendung lebender Organismen eher zu den klassischen und gut beherrschbaren Ansätzen gehört, und es hierfür auch entsprechend viele Beispiele gibt, ergeben sich doch Nachteile und Grenzen. Einen Hauptnachteil für die Anwendung in der evolutiven Biotechnologie stellen die vergleichsweise geringen Transformationseffizienzen in *E.coli* von 10^7 - 10^8 Kolonien pro μg DNA dar, welche die Komplexität von Mutantenbanken beträchtlich reduzieren können.

3. EVOLUTIVE BIOTECHNOLOGIE

Wird im zellfreien System gearbeitet, so können technisch definierte Umgebungen wie mikro- und nano-Titerplatten als Behältnisse dienen. Die Miniaturisierung ist bei den hohen Probenzahlen fast schon zwangsläufig und setzt hohe Ingenieursleistungen bei der Verteilung von kleinen Volumina voraus (Pipettierroboter). Eine besonders elegante Möglichkeit der Kompartimentierung *in vitro* stellen Wasser-in-Öl Emulsionen dar, bei denen die inerte Öl-Phase für eine räumliche Trennung der wässrigen Kompartimente sorgt [40, 106]. Diese Methode verspricht eine hohe Komplexität bei gleichzeitig leichter Handhabung und wurde daher experimentell in dieser Arbeit näher untersucht.

Völlig verzichtet werden kann auf Kompartimentierung, wenn es nur um die Genotyp und Phänotyp physikalisch miteinander verbunden sind, und positive Varianten rein über Affinitätschromatographie von negativen getrennt werden können. Ein Beispiel für die Entwicklung eines solchen Verfahrens zur *in vitro* Evolution ohne Kompartimentierung ist das von Plückthun und Mitarbeitern publizierte Ribosome-Display-System [45].

3.3.4 Expression

Liegt eine Bibliothek von unterschiedlichen genetischen Varianten – jeweils in räumlich isolierten Kompartimenten – vor, so muss der Übergang von der Informationsebene zur Funktionsebene geleistet werden. Erst durch Expression der Proteine wird es möglich, auf den „richtigen“ Phänotyp hin zu selektieren. Bei Arbeiten mit Mikroorganismen ist die Expression durch Induktion zu erreichen. Experimente im zellfreien System hingegen erfordern eine *in vitro* Translation [53], gegebenenfalls gekoppelt mit Transkription. Da die zur Proteinsynthese erforderliche Maschinerie sehr komplex ist, werden oftmals Extrakte aus z.B. *E.coli*, Retikulozyten oder Weizenkeimen verwendet. In dieser Arbeit wurde dazu ein S30-Ribosomenextrakt aus *E.coli* präpariert [67]. Auch ein mit ausschließlich rekombinant hergestellten Bestandteilen (außer Ribosomen) rekonstituiertes System zur zellfreien Translation ist schon realisiert [103].

3.3.5 Selektions-Strategien

Der englische Ausdruck „*you get what you screen for*“ [94] wird oft als erster Hauptsatz der gerichteten Evolution bezeichnet. Darin steckt die Erfahrung, dass der Ausgang von Evolutionsexperimenten von der Selektion abhängt. Selektion heißt allgemein, die einzelnen Varianten einer Molekülpopulation entsprechend ihres molekularen Phänotyps zu bewerten, und nur diejenigen einer weiteren Amplifikation zuzuführen, deren „Fitness“ oberhalb eines gewissen Schwellenwertes liegt (z.B. über dem Durchschnitt der eingesetzten Population). Welche Möglichkeiten der Selektion gibt es nun?

- **Amplifikations-gekoppelte Selektion:** Hierbei muss die zu selektierende Funktion (z.B. Polymeraseaktivität) direkt mit der Netto-Amplifikationsrate gekoppelt

sein. Dies ist bei *in vivo* Systemen oft auch durch den geschickten Einsatz von Resistenzen möglich. Diese Art der Selektion lässt sich mit geringem technischen Aufwand realisieren, jedoch ist insgesamt die Einsetzbarkeit eher gering.

- **Selektion durch physikalische Trennung:** Diese Strategie ist prinzipiell begrenzt auf Funktionen, die z.B. mit Bindungseigenschaften verknüpft werden können oder zu verschiedener Größe führen. Hierfür ist eine Genotyp-Phänotyp-Kopplung unbedingt notwendig.
- **Selektion durch Screening:** Um den Preis des hohen technischen Aufwandes besteht bei Screening-Verfahren eine sehr allgemeine Anwendbarkeit. Wichtig ist dieser Ansatz z.B. für die Selektion von Biokatalysatoren in Lösung. Das Zeitproblem bei sequentieller Durchmusterung hoher Probenzahlen kann durch die Reduktion von einzelnen Messzeiten verringert werden.

Die Wahl der richtigen Selektionsstrategie hängt also von der gesuchten Funktion ab und beim Screening vor allem von den zur Verfügung stehenden Techniken.

3.4 Wirkstoffsuche für die Pharmakologie

Ein sehr grosses, im englischen mit *drug discovery* bezeichnetes Gebiet beschäftigt sich ausschließlich mit dem Auffinden neuer Wirkstoffe für therapeutische Anwendungen. Dabei handelt es sich meist um kleinere Effektormoleküle, wie z.B. Peptide oder organische Substanzen [93]. Für die Strategien der Entwicklung solcher neuen Medikamente gilt auch hier wieder, dass mit zunehmendem Wissensstand ein deutlicher Umbruch zu verzeichnen ist. Während die ersten Wirkstoffe eher zufällig gefunden und angewendet wurden, obwohl ihr exakter Mechanismus zu damaliger Zeit keineswegs bekannt war, werden heute umgekehrt Substanzen zuerst anhand des Wissens um bestimmte Prozesse konstruiert, bevor sie später zur Anwendung kommen. Besonders in der Krebsforschung und in der Virologie sind bis jetzt viele Zusammenhänge aufgeklärt worden. Die Blockierung spezieller pathogener Prozesse durch synthetische Inhibitoren zählt heute zu den Ansätzen mit dem höchsten Potenzial.

Ein typisches Vorgehen zur Auffindung neuer solcher Inhibitoren beginnt zunächst mit der Erzeugung von Substanz-Bibliotheken durch kombinatorische Chemie [34, 74]. Aus der großen Zahl von unterschiedlichen Molekülen müssen mögliche Kandidaten identifiziert werden, die dann weiter untersucht werden können. Dieser Vorgang – im Prinzip eine Reduktion der Probenanzahl – wird auch als *Screening* bezeichnet. Technisch bereiten solche Screening-Verfahren jedoch bis heute erhebliche Probleme. Vor allem der notwendige hohe Probendurchsatz kann mit den herkömmlichen Methoden oft nicht erreicht werden. Für das Gelingen von Screening-Strategien sind daher neue Methoden und Technologien notwendig, die idealerweise folgende Kriterien erfüllen sollten:

3. *EVOLUTIVE BIOTECHNOLOGIE*

- universelle Anwendungsmöglichkeiten
- hohe Geschwindigkeit durch kurze Messzeiten
- geringer Probenverbrauch durch hohe Sensitivität
- Potenzial zur Automatisierung durch wenige Manipulationsschritte und Miniaturisierung

Als Einzelmolekül-sensitive Methode verspricht der Einsatz von Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (vgl. Kapitel 4), den aufgeführten Anforderungen gerecht zu werden, wenn es gelingt, biochemische Fragestellungen mit dieser Methode zu untersuchen. Die Assay-entwicklung ist daher von zentraler Bedeutung und stellt einen entsprechend großen Schwerpunkt in beiden Projekten dieser Arbeit dar.

4 Einführung in die FCS

4.1 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)

Zur Messung schneller chemischer Reaktionen wurden schon früh Relaxationsmethoden wie z.B. Temperatur- oder Drucksprung entwickelt [121], bei denen - nach Auslenkung - die Beobachtung der Rückkehr zum Gleichgewicht Gegenstand der Messung ist. Im Gegensatz zum Prinzip der Relaxationsmessungen ist, besonders für Anwendungen im biologischen Bereich, eine biophysikalische Messmethode wünschenswert (und oft sogar notwendig), mit der Reaktionen im thermodynamischen Gleichgewicht verfolgt werden könnten. Als eine solche Technologie wurde bereits 1972/1974 von Elson, Magde und Webb [31, 69, 70] die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) entwickelt, welche drei wesentliche Voraussetzungen zur Analyse von statistischen Fluktuationen im Gleichgewicht erfüllt:

- Die Detektion soll mit hoher Effizienz erfolgen und ein hohes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis bieten, weswegen in der FCS **Fluoreszenz** als Messparameter gewählt wird.
- Statt Ensembles vieler Moleküle müssen wenige bis **einzelne Moleküle** beobachtet werden, um ein Herausmitteln statistischer Fluktuationen zu vermeiden. Dem wurde durch die Entwicklung der *konfokalen* Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie Rechnung getragen [89], wobei eine Reduktion des Detektionsvolumens in den Femtoliter-Bereich möglich wird. Experimentell realisiert wird es solch kleines, offenes Volumenelement innerhalb der Probelösung mit einem konfokalen Aufbau (siehe Abb. 4), in welchem das Anregungslicht durch ein Objektiv hoher numerischer Apertur ($N.A. \geq 0.9$) fokussiert wird. Detektionsseitig erfolgt die Abbildung des sehr kleinen Detektionsvolumens auf den Detektor über eine Lochblende. Bei Konzentrationen im nanomolaren Bereich befinden sich nur einzelne Moleküle im Messvolumen.
- Gegenüber Messungen im Fluorimeter, die auf ein zeitlich besonders stabiles Signal abzielen (Integration), spielt bei Messungen weniger Moleküle im statistischen Gleichgewicht die **Zeitauflösung** eine Rolle, um Fluktuationen überhaupt erst erfassen zu können. Der Einsatz von Detektoren mit geringer Totzeit und gut zeitaufgelösten Korrelatorkarten erlaubt die Fluoreszenz-Korrelationsanalyse mit einer für biologische Anwendungen, insbesondere zur Diffusionsanalyse, ausreichenden Auflösung.

Fluktuation des Fluoreszenzsignales können durch verschiedene Phänomene hervorgerufen werden. Zum einen sind Veränderungen in der Helligkeit der einzelnen Fluoropho-

4. EINFÜHRUNG IN DIE FCS

re zu nennen, zu denen beispielsweise Änderungen in der Quantenausbeute (Förster-Transfer, Quenching) gehören, oder Verschiebungen in den Absorptions- und Emissionsspektren (Konformationsänderung, Protonierung/Deprotonierung). Auch photophysikalische Übergänge (Triplett-Zustand) beeinflussen die molekularen Helligkeiten. Eine weitere Ursache von Fluktuationen sind Änderungen der Konzentration der Fluorophore im Detektionsvolumen. Bei reiner Diffusion ohne Fluss oder Konvektion lässt sich über den Auswerteparameter *Diffusionszeit* direkt der Translationsdiffusionskoeffizient und damit der hydrodynamische Radius der fluoreszenzmarkierten Moleküle bestimmen. Die so gewonnenen Kenntnisse über die molekularen Dynamiken können ausgenutzt werden, um Reaktionen zu verfolgen, bei denen sich Edukte und Produkte in ihrem Molekulargewicht und damit in ihrer Beweglichkeit deutlich unterscheiden.

Um nun die durch Diffusion oder andere Phänomene hervorgerufenen Fluktuation mittels FCS zu bestimmen, wird aus der Fluoreszenzspur zunächst die Autokorrelationskurve berechnet - ein Prozess, der online während der Messung geschieht. Die Autokorrelationsanalyse beschreibt im Prinzip die Ähnlichkeit eines Signals mit sich selbst zu unterschiedlichen Zeitpunkten, und ergibt damit eine Zerfallsfunktion. Die Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ wird nach folgender Formel berechnet:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (2)$$

Der Ausdruck $\langle F(t) \rangle$ gibt das zeitliche Mittel des Fluoreszenzsignales an, während $\delta F(t)$ und $\delta F(t + \tau)$ zum Zeitpunkt t und $t + \tau$ die momentane Abweichung vom Mittelwert bezeichnen. Je nach Situation der Probe können nun verschiedene mathematische Modelle für die Autokorrelationsfunktion entwickelt und die Messkurve angefitet werden. So können aus dem Fit die entsprechenden Parameter gewonnen werden. Für den häufigen Fall von zwei Prozessen, die zu Fluktuationen führen – zum einen der Übergang in den Triplett-Zustand, zum anderen Diffusion durch das Fokolvolumen – lässt sich folgende Fitfunktion ableiten:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \cdot \frac{(1 - T(1 - e^{-\frac{\tau}{\tau_t}}))}{1 - T} \cdot \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_d}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + (\frac{r_0}{z_0})^2 \frac{\tau}{\tau_d}}} \quad (3)$$

Der Parameter N gibt die mittlere Anzahl der Moleküle im Fokus an, die Amplitude $G(0)$ ist also invers proportional zur Konzentration. Dies lässt sich anschaulich leicht dadurch erklären, dass bei wenigen Molekülen im Fokus der Ein- und Austritt von Teilchen zu starker Fluktuation führt als bei einer hohen Partikelzahl. Mit T wird der relative Anteil der Moleküle im Triplett-Zustand wiedergegeben. Da diese Teilchen dunkel sind, verringert sich scheinbar die Gesamt-Teilchenzahl, was sich in einer höheren Amplitude auswirkt. Die durch $G(0)$ gegebene Amplitude ist jedoch bereits um den Triplettanteil

4. EINFÜHRUNG IN DIE FCS

korrigiert, und N gibt die Summe der hellen und dunklen Teilchen an. Die schnellen Fluktuationen durch die Übergänge in den Triplett-Zustand werden durch τ_t beschrieben. Dieser Wert gibt die Triplett-Lebenszeit an und hat üblicherweise Werte von 1-2 μs für die hier verwendeten Fluorophore. Die mittlere Diffusionszeit wird durch den Parameter τ_d bezeichnet und liegt je nach Teilchengröße und Viskosität der Probe zwischen 20 μs bis hin zu etlichen ms. Aus der mittleren Diffusionszeit τ_d lässt sich mit der Beziehung

$$\tau_d = \frac{r_0^2}{4D} \quad (4)$$

der Diffusionskoeffizient D des Analyten berechnen [89]. Zur Annäherung der Geometrie des Fokalvolumens wird hier von einer dreidimensionalen, gaußförmigen Intensitätsverteilung im Brennpunkt ausgegangen. Dann kann das Anregungsvolumen durch ein Rotationsellipsoid beschrieben werden, wobei r_0 und z_0 jeweils diejenigen Entfernungen vom Mittelpunkt angeben, bei denen die Intensität auf den $\frac{1}{e^2}$ -fachen Wert abgefallen ist. Der allein durch den Aufbau bestimmte Quotient $\frac{z_0}{r_0}$ wird als Strukturparameter bezeichnet, und hat für das ConfoCor2-Instrument typischerweise einen Wert von etwa 6 (siehe auch S. 32). Der Diffusionskoeffizient D ist nach dem Stokes-Einstein-Gesetz umgekehrt proportional zum hydrodynamischen Radius R_h :

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h} \quad (5)$$

Es bezeichnen k die Boltzmann-Konstante, T die Temperatur und η die Viskosität. Der hydrodynamische Radius ist seinerseits wiederum proportional zur dritten Wurzel des Volumens der (hier als kugelförmig anzunehmenden) Teilchen, welches proportional zur Masse und damit zum Molekulargewicht ist. Insgesamt ergibt sich also eine Proportionalitätsbeziehung zwischen der Diffusionszeit τ_d und der dritten Wurzel des Molekulargewichtes M des Analyten:

$$\tau_d \propto \sqrt[3]{M} \quad (6)$$

Aufgrund dieses Zusammenhanges findet bei Reaktionen nur dann eine messbare Veränderung der Diffusionszeit statt, wenn die Reaktion mit einer drastischen Veränderung des Molekulargewichtes einhergeht.

Die Gleichung (3) wird auch als 1-Komponenten-Fit-Modell bezeichnet, da nur eine diffundierende Spezies angenommen wird. Für Mischsysteme mit mehreren, unterschiedlich mobilen Spezies gibt es Gleichungen, die zusätzliche Diffusionsterme tragen. Auch für andere Situationen als die hier dargestellte, freie dreidimensionale Diffusion existieren Fit-Modelle, wie z.B. zweidimensionale Diffusion (in Membranen) oder Fluss. Zusätzliche kurze Fluktuationen durch photophysikalische Effekte können durch die Aufnahme weiterer Exponentialterme in das Modell berücksichtigt werden.

4. EINFÜHRUNG IN DIE FCS

Zum Zeitpunkt ihrer Entwicklung vor mehr als 25 Jahren standen der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie noch nicht die technischen Voraussetzungen für eine breitgefächerte Anwendung zur Verfügung. Seit etwa fünfzehn Jahren hingegen existieren zunehmend die zur Anregung benötigten stabilen Lasersysteme, hochsensitive Detektoren und schnelle Computer, was enorm zur Optimierung der FCS-Technologie beigetragen hat. Auch die Synthese neuer photostabiler und wasserlöslicher Fluorophore mit hoher Quantenausbeute, die sich zum Markieren von biologischen Molekülen eignen, erhöhte die Anwendbarkeit der FCS im biochemischen, biologischen und diagnostischen Bereich.

4.2 Theorie der Zweifarben-FCS

Die in Abschnitt 4.1 dargestellte FCS eignet sich, um molekulare Dynamiken zu analysieren. Für die meisten Anwendungen im biochemischen Bereich spielt die Diffusionszeit als Fitparameter die entscheidende Rolle. Unterschiede in der Diffusionszeit, z.B. durch Bindung eines kleinen fluoreszenzmarkierten Liganden an einen großen Rezeptor, lassen sich leicht in Lösung messen. Ein Problem der Autokorrelationsanalysen besteht jedoch im dynamischen Bereich, da die molekulare Masse der Teilchen mit der dritten Wurzel in die Diffusionszeit eingeht (Gl. 6). Daher muss der Massenunterschied zwischen dem gebundenen und dem ungebundenen Fluoreszenz-markierten Liganden sehr groß sein, um ein gut trennbares Signal in der Autokorrelation zu erhalten. Dieses Problem kann durch die Einführung eines weiteren Fluoreszenzmarkers umgangen werden [29]. Dazu wird die Apparatur sowohl auf der Anregungs- als auch Detektionsseite für die Erfassung zweier spektral separierbarer Fluorophore erweitert. Es gibt eine Reihe von Fluorophorkombinationen, die spektral gut separierbare Emissions-Charakteristika z.B. im grünen und im roten Bereich haben. Die Fluoreszenzspuren der beiden Farbstoffe werden getrennt aufgenommen und miteinander kreuzkorreliert, woraus Rückschlüsse auf Konzentration der zweifarbig markierten Moleküle gezogen werden können. Die Kreuzkorrelation zweier Signale berechnet sich nach folgender Formel:

$$G_{ij}(\tau) = \frac{\langle \delta F_i(t) \delta F_j(t + \tau) \rangle}{\langle F_i(t) \rangle \langle F_j(t) \rangle} \quad (7)$$

Die Ausdrücke $\langle F_i(t) \rangle$ und $\langle F_j(t) \rangle$ bezeichnen jeweils das zeitliche Mittel des Fluoreszenzsignals i bzw. j in den beiden Kanälen, während $\delta F_i(t)$ und $\delta F_j(t + \tau)$ die Fluktuationen der Signale zum Zeitpunkt t bzw. $t + \tau$ darstellen. Für $i = j$ geht Gleichung (7) in die Autokorrelationsvorschrift (2) über. Für ein Mischsystem aus einfach grün markierten Species (g), einfach rot markierten Molekülen (r) sowie einem Anteil doppelt gelabelter Teilchen (gr) mit den jeweiligen Konzentrationen C_g , C_r und C_{gr} werden die Fluoreszenzintensitäten F_r im roten und F_g im grünen Kanal gemessen. Aus Gleichung

4. EINFÜHRUNG IN DIE FCS

(7) erhält man für $i = j = g$ die Autokorrelation $G_{gg}(\tau)$ des grünen Signals sowie analog dazu mit $i = j = r$ die Autokorrelation $G_{rr}(\tau)$ des roten Signals. Zusätzlich ergibt sich für $i = g$ und $j = r$ die Kreuzkorrelationsfunktion $G_{gr}(\tau)$. Nach [99] lassen sich Konzentrationen der einzelnen Species aus folgenden Auto- und Kreuzkorrelationsfunktionen entnehmen:

$$G_{gg}(\tau) = \frac{\langle C_g \rangle \text{Diff}_g(\tau) + \langle C_{gr} \rangle \text{Diff}_{gr}(\tau)}{V_{\text{eff}}(\langle C_g \rangle + \langle C_{gr} \rangle)^2} \quad (8)$$

$$G_{rr}(\tau) = \frac{\langle C_r \rangle \text{Diff}_r(\tau) + \langle C_{gr} \rangle \text{Diff}_{gr}(\tau)}{V_{\text{eff}}(\langle C_r \rangle + \langle C_{gr} \rangle)^2} \quad (9)$$

$$G_{gr}(\tau) = \frac{\langle C_{gr} \rangle \text{Diff}_{gr}(\tau)}{V_{\text{eff}}(\langle C_g \rangle + \langle C_{gr} \rangle)(\langle C_r \rangle + \langle C_{gr} \rangle)} \quad (10)$$

mit

$$V_{\text{eff}} = \pi \sqrt{\pi} r_0^2 z_0 \quad (11)$$

als effektivem Messvolumen.

Der Term

$$\text{Diff}_{i=g,r,gr}(\tau) \equiv \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{d,i}}\right)^{-1} \left(1 + \frac{r_0^2 \tau}{z_0^2 \tau_{d,i}}\right)^{-\frac{1}{2}} \quad (12)$$

bezeichnet den Abfall der Korrelationsfunktion mit zunehmenden τ . Da nur der Term Diff_i eine Zeitabhängigkeit aufweist, gilt für die Amplituden der Korrelationsfunktion, also wenn $\tau = 0$ ist:

$$G_{gg}(0) = \frac{\langle C_g \rangle + \langle C_{gr} \rangle}{V_{\text{eff}}(\langle C_g \rangle + \langle C_{gr} \rangle)^2} = \frac{1}{V_{\text{eff}}(\langle C_g \rangle + \langle C_{gr} \rangle)} \quad (13)$$

$$G_{rr}(0) = \frac{\langle C_r \rangle + \langle C_{gr} \rangle}{V_{\text{eff}}(\langle C_r \rangle + \langle C_{gr} \rangle)^2} = \frac{1}{V_{\text{eff}}(\langle C_r \rangle + \langle C_{gr} \rangle)} \quad (14)$$

$$G_{gr}(0) = \frac{\langle C_{gr} \rangle}{V_{\text{eff}}(\langle C_g \rangle + \langle C_{gr} \rangle)(\langle C_r \rangle + \langle C_{gr} \rangle)} \quad (15)$$

Die vorgestellten Gleichungen gelten nur bei freier Diffusion und in einem ideal justierten System, dessen beiden Anregungsvolumina sich vollständig überlappen. Bei der

4. EINFÜHRUNG IN DIE FCS

Auswertung der Autokorrelationskurven wird zumeist zusätzlich noch analog Gl. 3 ein Triplett-Term benötigt. Bei der Anpassung der Kreuzkorrelationskurven wird dieser idealerweise nicht benötigt, da die Übergänge in die Triplettzustände der roten und grünen Fluorophore völlig unabhängig voneinander stattfinden und daher zeitlich nicht korreliert sind. Durch Vergleich der Auto- und Kreuzkorrelationsfunktionen (13) bis (15) ergibt sich zunächst, dass die Autokorrelationsamplituden $G(0)$ in einem invers proportionalem Zusammenhang zu den Gesamtkonzentrationen $C_g + C_{gr}$ bzw. $C_r + C_{gr}$ der entsprechenden Farbe stehen. Für gegebene Autokorrelationsamplituden (d.h. wenn die Konzentrationen von Molekülen, die zumindest den roten Fluorophor und von Molekülen, die zumindest den grünen Fluorophor tragen nicht verändert werden) ist die Kreuzkorrelationsamplitude $G_{gr}(0)$ direkt proportional zur Konzentration von Teilchen, die beide Fluorophore in sich vereinigen. Durch die Kreuzkorrelationsanalyse wird also die zweifach markierte Species vom Hintergrund der einfach gelabelten Teilchen isoliert. Durch Einsetzen der Autokorrelationsamplituden (13) und (14) in den Nenner der Gleichung (15) ergibt sich folgende Beziehung:

$$\langle C_{gr} \rangle = \frac{G_{gr}(0)}{V_{eff} G_{gg}(0) G_{rr}(0)} \quad (16)$$

Demnach erhält man den relativen Anteil der doppelt markierten Species an der Gesamtkonzentration der Species einer Farbe i durch den Quotienten der Kreuzkorrelationsamplitude mit der Autokorrelationsamplitude der jeweils anderen Farbe j :

$$\frac{\langle C_{gr} \rangle}{\langle C_{i,total} \rangle} = \frac{G_{gr}(0)}{G_{jj}(0)} \quad (17)$$

mit $\langle C_{i,total} \rangle = \langle C_i \rangle + \langle C_{gr} \rangle$

Die Amplitude der Kreuzkorrelation kann theoretisch maximal die Höhe der niedrigeren Autokorrelationsamplitude erreichen.

Bis heute haben zahlreiche Publikationen die verschiedenen Applikationsmöglichkeiten [46, 96] der FCS und vor allem der deutlich vielseitigeren Zweifarben-FCS aufgezeigt, von denen einige ausgewählte Gebiete im Folgenden aufgelistet werden:

- Die **Diagnostik** von viraler RNA [79] wurde ebenso realisiert wie die sensitive Detektion von Prion-Aggraten [12].
- Im Bereich der **Biochemie** wurden Charakterisierungen wie Enzymkinetiken [59] oder Protein-Liganden-Wechselwirkungen [52, 87] mit FCS durchgeführt. Auch PCR-Reaktion konnten durch FCS verfolgt werden [88].

- Für die **Zellbiologie** wichtig ist die Tatsache, dass aufgrund des kleinen Fokalvolumens auch *in vivo* Messungen möglich sind. Messungen auf Membranen [4, 98] und in lebenden Zellen [5, 6, 24] sind beschrieben.
- Das Potenzial der Zweifarben-FCS für den Einsatz im **Hochdurchsatz-Screening** und in der **evolutiven Biotechnologie** [63, 64] wurde von Eigen und Rigler schon 1994 erkannt [29], bevor Schwille 1996 als erster die experimentelle Realisierung der Zweifarben-FCS gelang [95, 99].

Für viele Einsatzgebiete kann das Prinzip der FCS verwendet werden, wobei jedoch oft die speziellen Anforderungen zu einer Weiterentwicklung der Technik geführt haben. So bietet z.B. für zellbiologische Fragestellungen die Anregung mit Zweiphotonenübergang Vorteile [47, 97], während beispielsweise für Screening-Anwendungen die Koinzidenz-Auswertung für eine Verkürzung von Messzeiten sorgt [48, 122]. Aktuelle Bestrebungen zielen darauf ab, FCS mit anderen Verfahren zu kombinieren. So ergänzen sich FCS und bildgebende Verfahren (konfokale Laserscan-Mikroskopie) ideal, aber z.B. auch in der Mikrofluidik wird FCS erfolgreich eingesetzt [25].

4.3 Das kommerzielle ConfoCor2-Instrument

Basierend auf dem experimentellen Aufbau zur Zweifarben-FCS am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen, wurde von der Firma Carl Zeiss ein kommerzielles Gerät entwickelt. Das in dieser Arbeit vorrangig benutzte ConfoCor2-Instrument stellt bereits den Nachfolger des in nur wenigen Exemplaren gefertigten ersten Zweifarben-ConfoCor-Gerätes dar. Der Aufbau der Zweifarben-FCS ist im Geräteaufbau experimentell flexibel gestaltet, so dass vom Benutzer über Software-Steuerung verschiedene Strahlengänge zusammengestellt, abgespeichert und angewendet werden können.

Die beiden Anregungsstrahlen der verschiedenen Laser werden im Lasermodul mittels einer Feinjustiereinheit überlagert. Durch den AOTF (acousto-optical tunable filter) können die verschiedenen Wellenlängen selektiv abgeschwächt werden. Die Ansteuerung des AOTF erfolgt über die Geräte-Software und ersetzt die sonst üblichen Neutralfilter. Nach Passage des AOTF werden die Laserlinien in eine optische Faser eingekoppelt und so zum inversen Mikroskop geleitet. Dort sorgt ein motorisch verfahrbarer Kollimator für die Parallelisierung der beiden Anregungsstrahlen nach Austritt aus dem Lichtleiter. Über den dichroischen Spiegel 1 wird das Licht rückseitig in das Objektiv eingekoppelt. Wichtig für die FCS ist, dass Objektive mit hoher numerischer Apertur (N.A. ≥ 0.9) verwendet werden, deren Rückapertur bis zu etwa 70 % gefüllt wird. Dadurch entsteht ein in x- und y-Richtung scharf begrenzter Anregungsdoppelkegel von wenigen 100 nm Durchmesser – dies entspricht in etwa dem Größenbereich von *E.coli* Bakterien.

4. EINFÜHRUNG IN DIE FCS

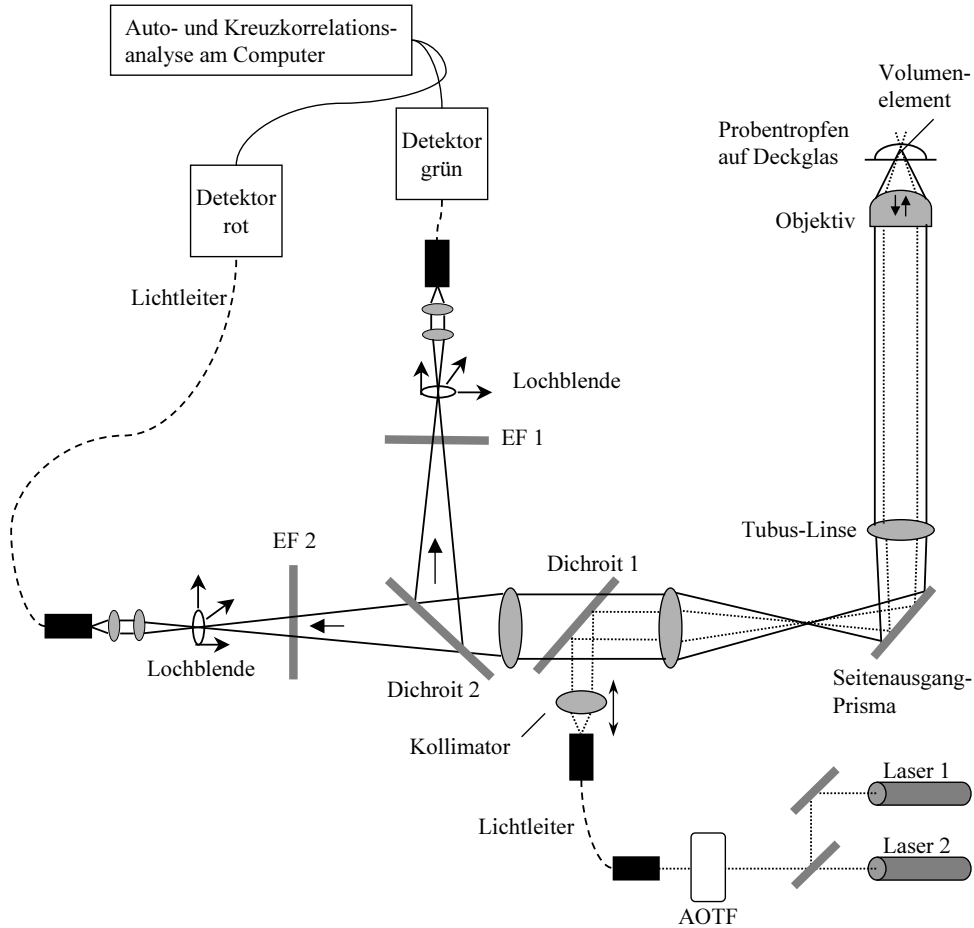


Abbildung 4: **Strahlengang der Zweifarben-FCS im ConfoCor2-Instrument**
 EF: Emissionsfilter; AOTF: acousto-optical tunable filter

Das Fluoreszenzlicht der Probe, welche sich auf einem Deckglas oder in einem Proben-träger mit Deckglasboden befindet, wird durch das Objektiv eingesammelt und kann den dichroischen Spiegel 1 passieren. Die beiden Spektralbereiche der unterschiedlichen Fluorophore werden durch den Dichroiten 2 getrennt. In beiden Detektionsoptiken passiert das Fluoreszenzlicht dann Bandpass- bzw. Langpass-Filter. Die beiden Lochblenden (pinholes) sind notwendig, um dem Detektionsvolumen eine Tiefenschärfe zu verleihen, die durch den Anregungskegel der Laser noch nicht gegeben ist. Die pinholes sind motorisch in allen drei Raumachsen, sowie im Durchmesser einstellbar. Übliche Öffnungen liegen im Bereich von 70-90 μm beim ConfoCor2-Gerät. Zur Detektion wird das Licht beider Kanäle jeweils in einen Lichtleiter eingekoppelt und auf hocheinsensitive Detektoren (Avalanche-Photodioden, APDs) abgebildet. Die Pulse der Detektoren werden direkt an den Auswerte- und Steuerrechner übertragen, wo während der Messung die Korrelationsanalyse online vorgenommen wird. Es werden – je nach Einstellung im Programm –

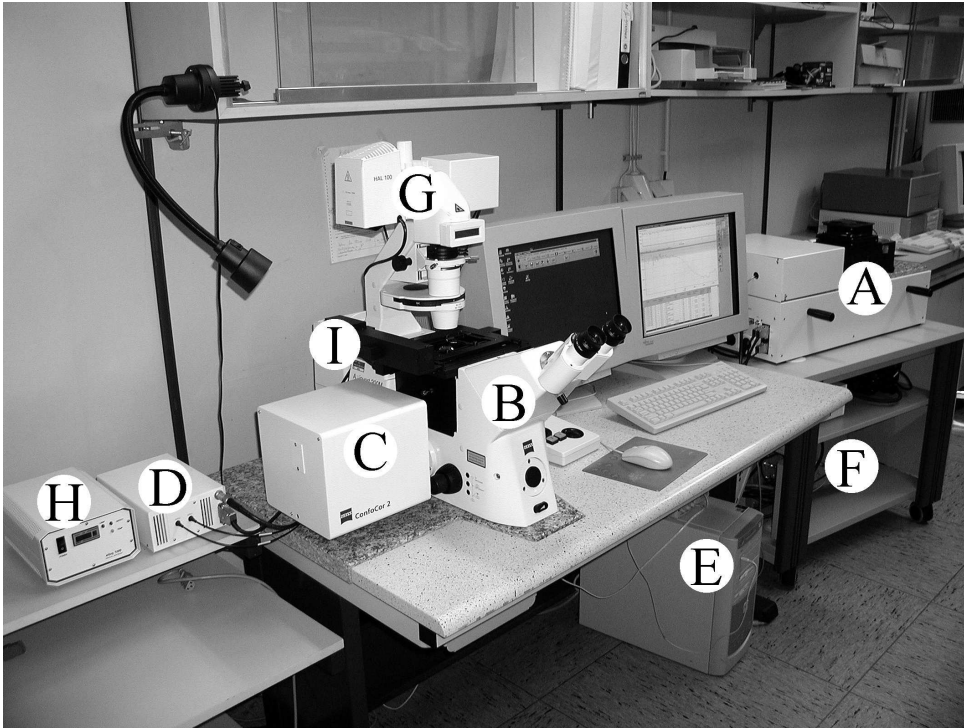


Abbildung 5: Das ConfoCor2-Instrument

A: Lasermodule; **B:** inverses Mikroskop Axiovert 200 M; **C:** FCS-Modul mit Einkopplungs- und Detektionsoptiken; **D:** Detektoren (avalanche Photodioden, APD); **E:** Steuer- und Auswerte-PC; **F:** Systemelektronik; **G:** Durchlichteinheit für Lichtmikroskopie; **H:** Transformator für die Quecksilberlampe (**I**), welche als Lichtquelle für die Fluoreszenzmikroskopie dient

die beiden Autokorrelationsfunktionen sowie die Kreuzkorrelation beider Kanäle im Verlauf der Messung berechnet. Als Anregungswellenlängen stehen die Linien verschiedener Laser zur Verfügung (vgl. Abb. 6). Diese sind durch die Software einzeln auswählbar und in ihrer Intensität regelbar. Die Shutter zur Blockierung bzw. Freigabe der Lichtwege sind ebenfalls im Lasermodule angeordnet. Sämtliche dichroischen Spiegel sowie die Emissionsfilter sind intern im FCS-Modul als motorisierte Filterräder gestaltet, so dass per Software verschiedene Filterkombinationen eingestellt werden können (Tab. 1). Die so definierten Strahlengänge können gespeichert werden und für die Messungen später wieder aufgerufen werden.

4.4 Messung und Auswertung

Die erhaltenen Korrelationskurven werden direkt am Gerät mit den entsprechenden mathematischen Modellen nach den Gleichungen (3) bzw. (10) angefitet. Alternativ be-

4. EINFÜHRUNG IN DIE FCS

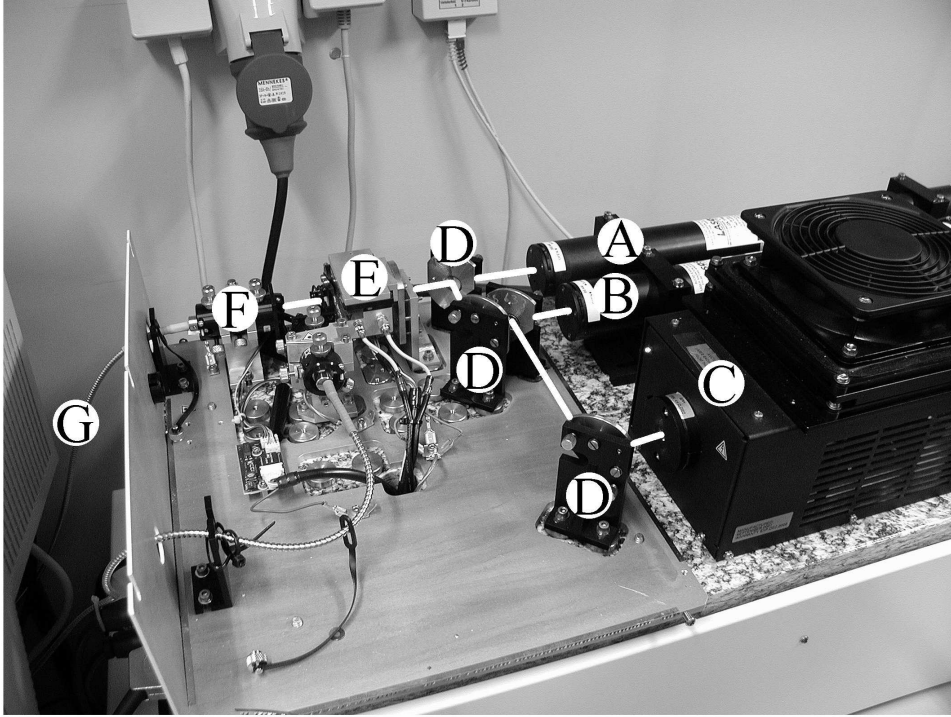


Abbildung 6: **Das Lasermodule**

A: Helium-Neon-Laser 543 nm; **B:** Helium-Neon-Laser 633 nm; **C:** Argon-Ionen-Laser 458, 477, 488 und 514 nm ; **D:** Spiegel zur Überlagerung der Laserstrahlen; **E:** elektronisch regelbarer Abschwächer (acousto-optical tunable filter, AOTF) mit Shutter; **F:** Faser-Einkopplung; **G:** Lichtleiter zum Mikroskop

steht die Möglichkeit, die Kurvenanpassung mit einer anderen Software (Origin, Microcal) ebenfalls unter Verwendung einer Marquardt Nonlinear-Least-Square-Regressionsroutine vorzunehmen. Abbildung 7 zeigt eine Autokorrelationskurve für frei in Wasser diffundierenden Farbstoff mit τ in logarithmischer Auftragung. Aus der Kurvenanpassung können der Strukturparameter $\frac{z_0}{r_0}$ des Aufbaus, und die Amplitude $G(0)$ (und damit die inverse Teilchenzahl $\frac{1}{N}$) sowie die Diffusionszeit τ_d des Moleküls entnommen werden. Die bei diesem Fluorophor zusätzlich durch Übergänge in den Triplett-Zustand auftretenden Fluktuationen werden durch die Fitfunktion ebenfalls ermittelt. Bei Kenntnis des effektiven Volumens V_{eff} lässt sich nach Gleichung (13) aus der Amplitude der Korrelationskurve im grünen Kanal leicht die reale Gesamt-Konzentration an grünen Teilchen berechnen. V_{eff} kann hier durch die gezeigte Referenzmessung von grünem Farbstoff mit bekanntem Diffusionskoeffizienten bestimmt werden. Mit den erhaltenen Fitwerten von $\frac{z_0}{r_0} = 6,4$ für den Strukturparameter und $\tau_d = 23\mu s$ als Diffusionszeit sowie dem bekannten Diffusionskoeffizienten D des Farbstoffes *Rhodamine Green* ($D_{RhG} = 2,8 \cdot 10^{-10} m^2 s^{-1}$) ergibt

Dichroit 1	Dichroit 2	Emissionsfilter 1	Emissionsfilter 2
458	570	BP 475-525	BP 530-600
488	635	LP 475	BP 560-615
514	Spiegel	BP 505-530	BP 585-615
543	Loch	BP 505-550	LP 585
633	50/50 IR	LP 505	LP 650
488/543		BP 530-600	
488/633		LP 530	
		LP 585	

Tabelle 1: Wählbare Spiegel und Filter im ConfoCor2

Der Dichroit 1 wird innerhalb der Gerätesoftware auch als Hauptfarbteiler (HFT) bezeichnet, während der Dichroit 2 auch NebenfARBteiler (NFT) heißt. Die Zahlenangaben bezeichnen jeweils die Wellenlängen (nm), die von den dichroischen Spiegeln reflektiert, bzw. von den Emissionsfiltern durchgelassen werden. BP: Bandpass-Filter; LP: Langpass-Filter; 50/50 IR: ein Spiegel, der jeweils 50 % des Gesamtlichtes reflektiert und durchlässt.

sich nach der Beziehung $r_0 = \sqrt{4D\tau_d}$ und der Formel (11) hier ein effektives Volumen von ca. 0,14 fl. Aus dem Fit erhält man die mittlere Anzahl der Moleküle im Messvolumen, $N = 3,2$, woraus sich die Konzentration der Lösung zu ca. 40 nM errechnet. Durch eine solche Referenzmessungen mit freiem Farbstoff kann der Strukturparameter vorher bestimmt werden und dann als Fitparameter für die Auswertung der darauf folgenden Messungen fixiert werden.

In Abbildung 8 ist eine typische Kreuzkorrelationskurve gezeigt, wie sie im ConfoCor2-Gerät mit doppelt markierter DNA gemessen wird. Für die Fitroutine wurde hier der aus der Referenzmessung bekannte Strukturparameter fixiert. Ausgewertet wurde die Kurve nach Gleichung (3), wobei der Triplet-Term weggelassen wurde. Aus den Fitparametern konnten die Amplitude $G(0)$ und die Diffusionszeit τ_d der zweifach markierten Spezies entnommen werden. Je nach Reaktionsrichtung kann die Amplitude der Kreuzkorrelation zu- oder abnehmen. Bei Anlagerung (Hybridisierung) einer markierten Sonde an ein spektral anders gelabeltes Ziel-Molekül baut sich beispielsweise Kreuzkorrelation auf [95], während Spaltung eines doppelt gelabelten Moleküls zu einer Abnahme der Kreuzkorrelationsamplitude führt [59, 86]. Bei beiden Reaktionen bleibt die Gesamtfluoreszenz idealerweise konstant, weswegen sich die Amplituden der Autokorrelationen nicht ändern sollten.

4. EINFÜHRUNG IN DIE FCS

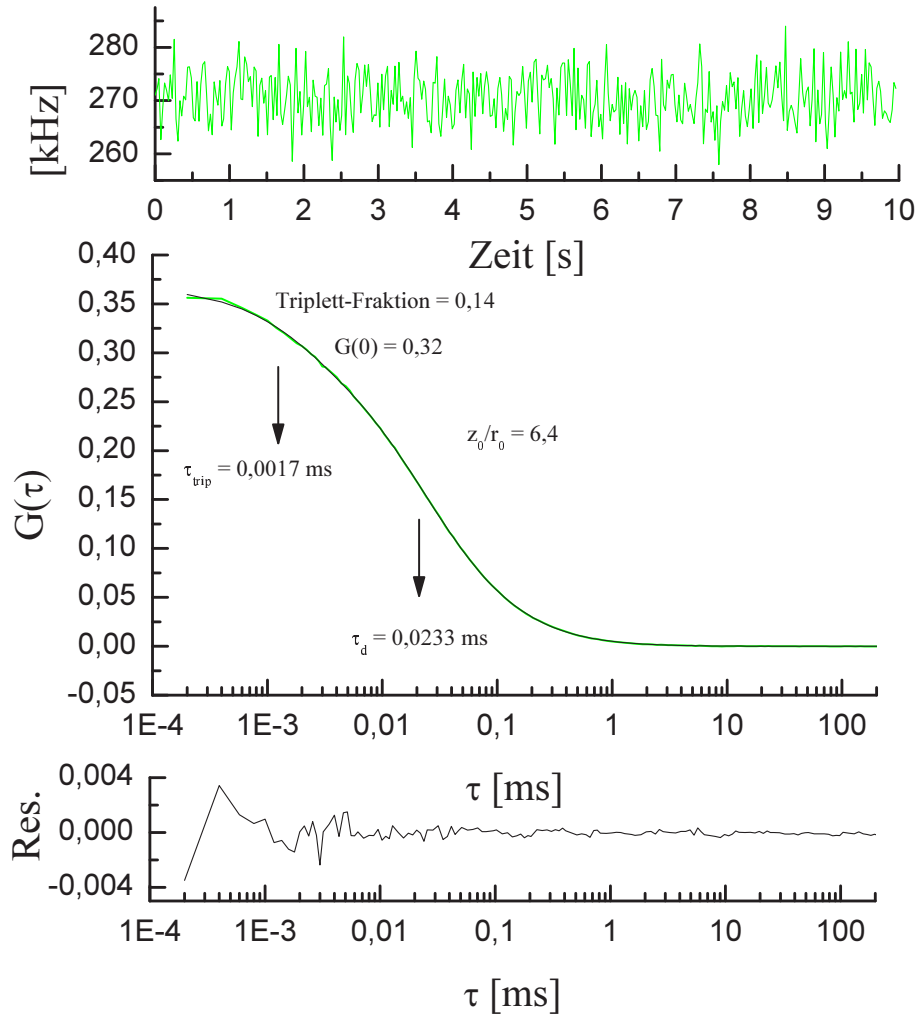


Abbildung 7: **Autokorrelationsfunktion**

Fluorophor: Rhodamine green; Messzeit: 10 x 10 sec; pinhole-Durchmesser: 90 μm ; Objektiv: 40x C-Apochromat, Wasserimmersion, 1.2 numerische Apertur; **oben:** Fluoreszenzspur; **Mitte:** Autokorrelationskurve (grün) und Fitkurve (schwarz); **unten:** Fit-Residuen

4.4.1 Ermittlung der relativen Kreuzkorrelation

Für Messungen, bei denen es auf den Vergleich von Kreuzkorrelationsamplituden ankam, wurde die Berechnung des relativen Anteils an doppelt markierter Spezies jeweils durch die Normierung der Kreuzkorrelationsamplitude auf die niedrigere Autokorrelationsamplitude $G(0)$ gemäß Gleichung 17 durchgeführt. Die niedrigere Amplitude $G(0)$ der beiden Autokorrelationen hatte am ConfoCor2 immer die Autokorrelation des roten Kanals, da das rote Volumenelement beugungsbedingt größer war und darin dementsprechend mehr

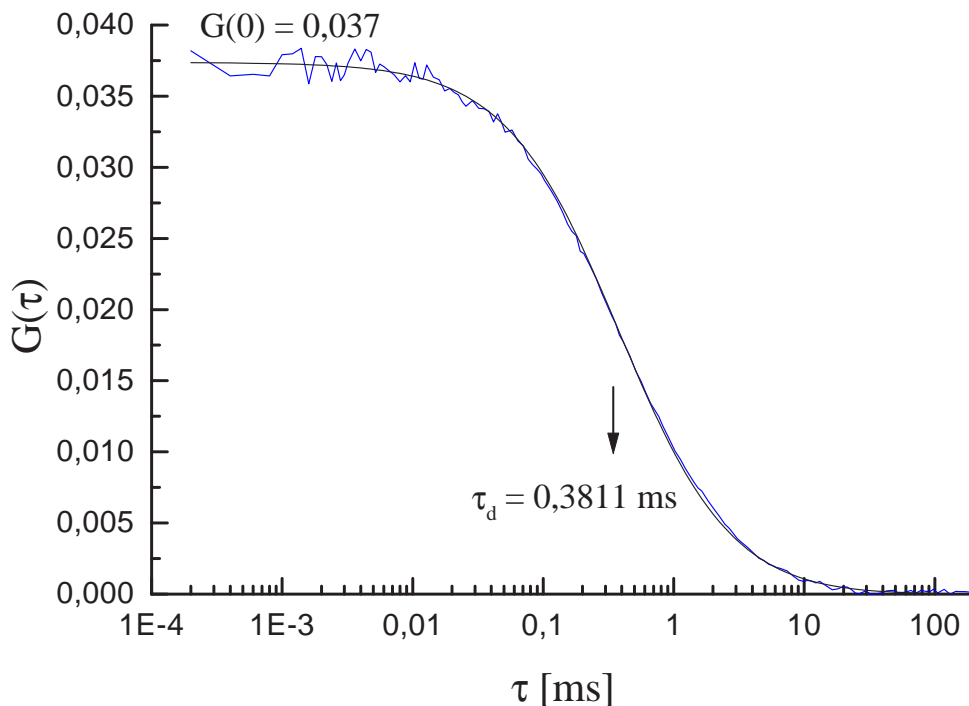


Abbildung 8: **Typische Kreuzkorrelationskurve**

Analyt: doppelt markierte DNA mit Rhodamine green und Cy5; Messzeit: 10 x 10 sec; pinhole-Durchmesser: 90 μm ; Objektiv: 40x C-Apochromat, Wasserimmersion, 1.2 numerische Apertur; Fitparameter: Strukturparameter fixiert auf 6,4; $G(0) = 0,037$; Diffusionszeit = 0,3811 ms; Messkurve: blau; Fitkurve: schwarz

Teilchen detektiert wurden. Dadurch sind auch die gemessenen Diffusionszeiten der roten Teilchen größer, als die der grün markierten.

Für die normierten Kreuzkorrelations-Amplituden bedeutet $G(0)=1$, dass *alle* Moleküle der Spezies, die eine niedrigere Teilchenzahl in der Autokorrelation zeigt (hier: grüner Kanal), auch den jeweils anderen Farbstoff tragen, also doppelt markiert sind und damit kreuzkorrelieren. Am hier benutzten ConfoCor2 lag die selbst mit optimal aufgereinigten, doppelt markierten Proben maximal erreichbare normierte Amplitude bei $G(0)=0,7$. Grund dafür ist die durch chromatische Abberation verursachte, nicht ideale Überlappung der Anregungs- und Detektionsvolumina. Die Beobachtung von relative Änderungen in $G(0)$ innerhalb einer Reaktion wird durch diesen Effekt jedoch kaum beeinflusst.

5. MATERIAL UND METHODEN

Bezeichnung	Genotyp	Eigenschaften
XL1-blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>pro-AB lacI^q ZΔM15 Tn10</i> (Tet ^r)]	Tetracyclin-Resistenz, gut für Plasmid-Transformationen geeignet
BL21(DE3)	<i>E.coli</i> B F ⁻ <i>dcm ompT hsdS(r_b⁻ m_b⁻) gal λ</i> (DE3)	exprimiert T7-RNA Polymerase unter Kontrolle des <i>lacUV5</i> Promotors, sehr gut einsetzbar für Protein-Expression in Kombination mit pET-Vektoren
KW-251	<i>supE44 galK2 galT22 metB1 hsdR2 mcrB1 mcrA</i> [<i>argA81::Tn10</i>] <i>recD1014</i>	aufgrund der fehlenden ExoV-Aktivität (Marker <i>recD1014</i>) nach Präparation von S30-Ribosomenextrakten besonders für die Verwendung von linearen Templates in der <i>in vitro</i> Translation empfehlenswert
TOP10	F ⁻ <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	enthalten im TOPO-Cloning Kit

Tabelle 2: *Genotypen der verwendeten E.coli Stämme*

5 Material und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Bakterienstämme und Plasmide

Alle benutzten Bakterienstämme waren *E.coli*-K12-Derivate. Für die Transformation und Propagation von Plasmiden kam der Stamm XL1-blue (Stratagene, Heidelberg) zu Anwendung, während zur Expression von Proteinen der Stamm BL21(DE3) eingesetzt wurde. Die Präparation des S30-Ribosomenextraktes erfolgte aus dem Stamm KW-251 (Promega, Mannheim), und die TOPO-Cloning Kits enthielten den chemisch kompetenten Stamm One Shot TOP10 (Invitrogen, Heidelberg). Das Plasmid pQBI63 wurde von Quantum, Grünberg bezogen, pET24a(+) stammte von Novagen, Schwalbach/Taunus und pDsRed sowie pEGFP-N1 waren von Clontech, Heidelberg.

5.1.2 Enzyme, Biochemikalien und Kits

Agarose für Gelelektrophorese	Roth, Karlsruhe
Alexa488	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Alkaline Phosphatase, calf intestinal (CIAP) 10 U/ μ l	NEB, Frankfurt
Alkaline Phosphatase, shrimp (SAP) 1 U/ μ l	Boehringer, Mannheim
Benchmark Proteinstandard	GibcoBRL, Karlsruhe
Coomassie Protein Assay Reagent	Pierce, Bonn
DNA-Marker, 1 kb, 1 kb+ und 100 bp	GibcoBRL, Karlsruhe
DNA Sequencing Kit 404079	PE Biosystems, Weiterstadt
Dünnschichtchromatographieplatte SIL G-25 UV ₂₅₄	Merck, Darmstadt
Expand High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim
HiTrap Chelating Säulen	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Mineralöl, light-white (M-5904)	Sigma, Taufkirchen
MiniElute PCR-Purification Kit	Qiagen, Hilden
NAP (nucleic acid purification) Säulen	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Oligonukleotide, allg. Auftragssynthesen	IBA GmbH, Göttingen
Oligonukleotide für Codon-Optimierung	Eurogentec, Seraing, Belgien
Pipettenspitzen Gilson	Abimed, Langenfeld
Plastikware	Becton Dickinson, Heidelberg
Pluronic F-127 (P-2443)	Sigma, Taufkirchen
QiaFilter Plasmid Midi und Maxi Kits	Qiagen, Hilden
QiaPrep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick Gel-Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick PCR-Purification Kit	Qiagen, Hilden
Q Sepharose Fast Flow	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Restriktionsenzyme	GibcoBRL, Karlsruhe; NEB, Frankfurt
Rotiphorese Gel30 und Gel40	Roth, Karlsruhe
SimplyBlue-Safestain (für Proteingele)	Invitrogen, Heidelberg
Span80 (85548)	Fluka, Deisenhofen
Synthese-Chemikalien f. DNA-Synthese	PE Biosystems, Weiterstadt
T4-DNA Ligase 400.000 U/ml	NEB, Frankfurt
T4-Polynukleotid-Kinase 15 U/ μ l	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
T4-Topoisomerase-II	Geschenk von Dr. K. Kreuzer, Durham, NC, USA
T7-RNA Polymerase 50 U/ μ l	GibcoBRL, Karlsruhe
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin)	Fluka, Deisenhofen
TWEEN80 (P-8074)	Sigma, Taufkirchen
Ultrahülsen UT 100/25 zur Dialyse	Schleicher & Schuell, Dassel
Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit	Invitrogen, Heidelberg

5. MATERIAL UND METHODEN

5.1.3 Fluorophore und Quencher

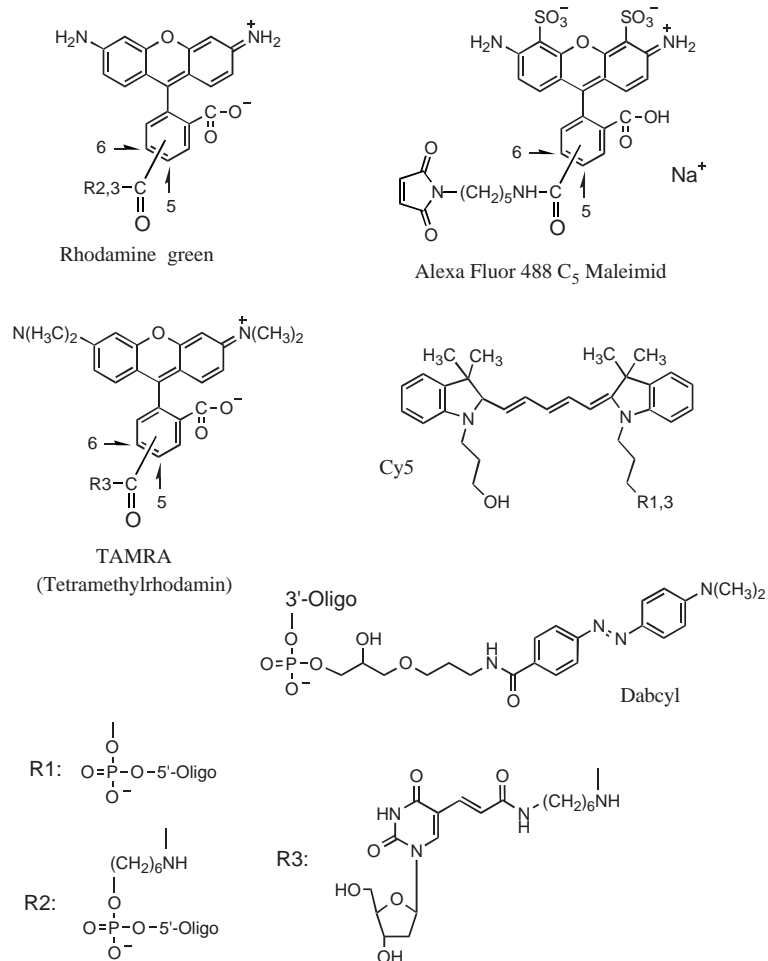


Abbildung 9: **Strukturformeln der verwendeten Fluorophore und Quencher**

Die Reste 1 und 2 geben an, wie die Fluorophore am 5'-Ende der DNA sitzen, Rest 3 zeigt die interne Markierung an 5-C6-Amino-2'-deoxythymidine. Alexa488 wurde nicht zur DNA-Markierung verwendet. Rhodamine green, TAMRA und Alexa488 wurden als gemischte 5-/6-Isomere eingesetzt. Dabcyl ist ein Quencher und wurde für 3'-Markierung von DNA benutzt.

Substanz	λ_{abs}	λ_{em}	ϵ	ϕ	λ_{ex}
Alexa 488	493	516	72.000	?	488
Rhodamine green	504	532	78.000	0,20	488
TAMRA	547	576	91.000	0,15	514
Cy5	649	670	250.000	0,28	633
Dabcyl	453	keine Em.	32.000	-	-

Tabelle 4: Spektrale Daten der verwendeten synthetischen Fluorophore und Quencher

λ : Maximale Absorptions- und Emissions- sowie Anregungswellenlänge in nm; ϵ : Extinktionskoeffizient in $M^{-1}cm^{-1}$; ϕ : Quantenausbeute in H_2O

5.1.4 Puffer, Lösungen und Medien

Zum Ansetzen der angegebenen Puffer und Medien wurde deionisiertes H_2O verwendet, welches auch benutzt wurde, um die Arbeitslösungen aus den konzentrierten Stock-Lösungen herzustellen. Alle Chemikalien und Lösungsmittel besaßen den Reinheitsgrad p.a. und wurden bezogen von Sigma/Fluka, Deisenhofen; Merck, Darmstadt; Serva, Heidelberg; Roth, Karlsruhe oder Baker, Deventer. Enzymatische Reaktionen wurden mit Wasser in HPLC-Qualität (LichroSolv, Merck) angesetzt.

Ampicillin (1.000x konzentriert)	100 mg/ml Na-Ampicillin in H_2O Lagerung in Aliquots bei $-20^\circ C$
Annealingpuffer (3x konzentriert)	30 mM Tris-HCl pH 8,0 150 mM NaCl 3 mM Na-EDTA
APS (Radikalstarter für PAGE)	40 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat in H_2O Lagerung in Aliquots bei $-20^\circ C$
Dialysepuffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,4 bei $4^\circ C$ 1 M NaCl 1 mM EDTA 10 % (v/v) Glycerol 2 mM DTT 0,2 μm filtriert
DNA-Ladepuffer	20 mM EDTA

5. MATERIAL UND METHODEN

(für ssDNA, 1,4x konzentriert)	0,025 % (w/v) Bromphenolblau 0,025 % (w/v) Xylencyanol 30 % (w/v) Ficoll 81 % (v/v) Formamid
DNA-Probenpuffer (für dsDNA, 6x konzentriert)	0,25 % (w/v) Bromphenolblau 40 % (w/v) Saccharose
Elektroelutionspuffer (100x Konzentrat)	1 M Tris-Acetat pH 8,0 10 mM EDTA
Ethidiumbromid	1 $\mu\text{g/ml}$ in H_2O
FLP-Puffer 1	25 mM TAPS, pH 8,0 1 mM EDTA 180 mM NaCl 2 mM MgCl_2 20 % (v/v) Glycerin 10 % (wt/v) PEG 8000 2,5 mg/ml BSA
FLP-Puffer 2	25 mM Tris-HCl, pH 7,5 200 mM NaCl 5 % (v/v) Glycerin
FLP-Puffer 3	50 mM Tris-HCl, pH 7,4 150 mM NaCl 10 mM MgCl_2
FLP-Puffer 4	wie FLP-Puffer 2, zusätzlich 0,05 % (w/v) Pluronic-F127
FLP-Puffer 5	50 mM Tris-HCl, pH 7,4 150 mM KCl 10 mM MgCl_2 100 $\mu\text{g/ml}$ BSA 0,05 % (w/v) Pluronic-F127
FLP-Puffer 6	50 mM Tris-HCl, pH 7,4

5. MATERIAL UND METHODEN

	10 mM MgCl ₂ 100 µg/ml BSA 0,05 % (w/v) Pluronic-F127
FLP-Puffer 7	50 mM Tris-HCl, pH 7,4 10 mM MgCl ₂ 0,05 % (w/v) Pluronic-F127
Gensynthese-Puffer (10x konzentriert)	100 mM Tris-HCl pH 9,0 22 mM MgCl ₂ 500 mM KCl 1 % (v/v) Triton X-100
Hochsalzpuffer (für Elektroelution)	3 M Na-Acetat pH 5,2 0,02 % (w/v) Bromphenolblau
IPTG	1 M IPTG in H ₂ O Lagerung in Aliquots bei -20 ° C
Kanamycin (1.000x konzentriert)	30 mg/ml Kanamycin in h ₂ O Lagerung in Aliquots bei -20 ° C
LB-Medium	5 g/L Hefe-Extrakt 10 g/L NaCl 10 g/L Bacto-Trypton (für Platten zus. 20 g/L Agar) autoklavieren
PMSF	100 mM PMSF in Ethanol Lagerung bei -20 ° C
Puffer A	50 mM Tris-HCl, pH 7,4 bei 4 ° C 150 mM NaCl 10 mM Imidazol 10 % (v/v) Glycerol 0,2 µm filtriert
Puffer B	wie Puffer A, jedoch 200 mM Imidazol

5. MATERIAL UND METHODEN

Puffer B₄₀₀	wie Puffer B, jedoch 400 mM NaCl
Puffer S	50 mM Tris-HCl, pH 7,4 bei 4 ° C 150 mM NaCl 10 mM Imidazol
S30-Dialysepuffer	10 mM Tris-Acetat, pH 8,0 14 mM Mg-(Acetat) ₂ 60 mM KCl 1 mM DTT auf 4 ° C kühlen
S30-Lysepuffer	10 mM Tris-Acetat, pH 8,0 14 mM Mg-(Acetat) ₂ 60 mM KCl 50 µg/ml PTSF auf 4 ° C kühlen
S30-Medium	10 g/L Hefe-Extrakt 5,6 g/L KH ₂ PO ₄ 28,9 g/L K ₂ HPO ₄ autoklavieren, anschließend pro L Medium 40 ml sterile Glucose-Lsg. (25 % (v/v)) zusetzen
S30-Präinkubationsmix	750 mM Tris-Acetat, pH 8,0 7,5 mM DTT 21,3 mM Mg-(Acetat) ₂ je 75 µM aller 20 L-Aminosäuren 6 µM ATP 20 mg/ml Na ₃ -PEP 5 U/ml Pyruvatkinase frisch ansetzen, auf 4 ° C kühlen
S30-Reaktionsmix	35 mM Tris-Acetat pH 8,0 2 mM DTT je 0,5 mM aller 20 Aminosäuren

5. MATERIAL UND METHODEN

	2 mM ATP je 0,5 mM CTP, GTP und UTP 20 mM Phosphoenolpyruvat 0,1 mg/ml <i>E.coli</i> -tRNA 35 mg/ml Polyethylenglycol 8.000 20 μ g/ml Folinsäure 8 mM Mg-Acetat·4 H ₂ O 180 mM K-Glutamat 35 mM NH ₄ -Acetat frisch ansetzen, Lagerung in kleinen Aliquots bei -80 ° C
Topoisomerase II Puffer	40 mM Tris-HCl pH 7.6 60 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 0.5 mM EDTA 0.5 mM DTT 30 μ g/ml BSA 0.5 mM ATP
S30-Waschpuffer	wie S30-Lysepuffer, jedoch zus. 6 mM β -Mercaptoethanol
TAE-Puffer (für Agarose-Gelelektrophorese, 50x)	2 M Tris-Acetat 50 mM EDTA
TBE-Puffer (für PAGE, 10x konzentriert)	1 M Tris-HCl pH 8,0 1 M Borsäure 20 mM EDTA

5.1.5 Geräte

Absorptionsphotometer DU 7400	Beckmann-Coulter, Unterschleißheim
ConfoCor2 mit Laserscanning-Einheit	Carl Zeiss, Jena
Dampfsterilisator Varioklav	H+P Labortechnik, München
DNA-Sequencer ABI 373A	PE Biosystems, Weiterstadt
DNA-Synthesizer Expedite 8909	PE Biosystems, Weiterstadt
Elektroporator 1000	Stratagene, Heidelberg

5. MATERIAL UND METHODEN

Elektrophoreseapparatur, Agarose	AGS, Heidelberg
Elektrophoreseapparatur, PAGE	GibcoBRL, Karlsruhe
Elektrophorese-Netzgerät ECPS 3000/150	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Fluoreszenzspektrometer, LS-50	PE Biosystems, Weiterstadt
FPLC-Anlage	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
French-Press	Sim Aminco, Rochester, USA
Inkubationsschüttler	Infors HT, Bottmingen, CH
Inkubatoren	Kendro, Hanau
Küvetten, f. Fluoreszenz und Abs.	Hellma, Müllheim
Lichtstreuapparatur	AMTEC, Villeneuve-Loubet, Frankreich
PCR-Cycler, TRIO	Biometra, Göttingen
PCR-Cycler, RoboCycler 40 gradient	Stratagene, Heidelberg
pH-Meter Mikroprozessor 535	WTW, Weilheim
SpeedVac-Konzentrator	Bachhofer, Reutlingen
Tischautoklaven Matachana	Rettberg, Göttingen
Tischzentrifuge, Eppendorf 5415	Eppendorf, Hamburg
Ultraturrax T8, S8N-5G	IKA, Staufen
Zentrifuge Sorvall RC-5B	DuPont Instruments, Bad Homburg

5.1.6 Software

DNAsis 3.2 für Mac (DNA-Analyse)	Hitachi Software Engineering
FCS-LSM Programm zum ConfoCor2	Carl Zeiss, Jena
FL-WinLab (LS-50 Software)	PE Biosystems, Weiterstadt
GCG-Wisconsin Package 10.2-UNIX (DNA-Analyse)	Genetics Computer Group(GCG), Madison, Wisc., USA
Magellan2 (Plattenlesegerät)	Tecan, Crailsheim
Oligo 6.44 (Primerdesign)	MedProbe, Oslo, Norwegen
Origin 4.1 / 6.1 (Datenauswertung)	Microcal, Northampton, MA, USA
PSDW 2.31 (Partikelgrößenbestimmung)	Brookhaven Instruments, Worcestershire, UK
ReferenceManager 9	ISI ResearchSoft, Carlsbad, CA, USA
ScionImage beta 3b (Bildauswertung)	Scion Corp., Frederick, Maryland, USA
Staden-Package	Rodger Staden, MRC, Cambridge, UK
Windows 2000 (Betriebssystem)	Microsoft, Seattle, WA, USA
X-Win32 V5.4.1 (UNIX-Terminal)	NUS, Göttingen

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Oligonukleotide

Synthese von Oligonukleotiden Oligodesoxyribonukleotide wurden mit Hilfe der Phosphoramidit-Chemie als Festphasensynthese auf dem Expedite DNA-Synthesizer hergestellt. Als Synthese-Parameter wurde *trityl-off-synthesis* eingestellt, so dass am 5'-Ende der DNA keine Tritylgruppen verblieben. Zum Einsatz kamen controlled pore glass (CPG) Säulen im 0,2 μmol Maßstab. Im Anschluss an die Synthese erfolgte das Eluieren der Oligonukleotide von den Säulen durch zweistündige Inkubation mit 1 ml Ammoniak (30 %) bei Raumtemperatur, worauf die weitere Inkubation über Nacht bei 55 ° C für die Entfernung der Schutzgruppen sorgte. Ein Entsalzungsschritt mit NAP-5 Säulen führte dann zu 1 ml wässriger Oligonukleotid-Lösung, die im SpeedVac-Konzentrator getrocknet und in 100 μl H₂O gelöst bei -20 ° C gelagert wurde. Längere Oligonukleotide (> 60 bp) wurden noch PAGE-gereinigt.

Einige Oligonukleotide, insbesondere mit Farbstoffmodifikationen, wurden auch als Auftragssynthese in den Reinigungsstufen *molecular biology-grade*, *HPLC-grade* oder *PAGE-grade* bestellt und hatten eine eingestellte Konzentration von 100 μM .

Hybridisierung von Oligonukleotiden Die Hybridisierung komplementärer Oligonukleotide erfolgte in Annealingpuffer durch thermische Denaturierung bei 95 ° C für 2 min mit anschließender langsamer, linearer Abkühlung über eine Stunde (-1,2 ° C/min) auf Raumtemperatur (23 ° C, 10 min halten, dann 4 ° C). Das Temperaturprofil wurde im PCR-Block gefahren. Die äquimolaren Konzentrationen der Oligonukleotide im Annealingansatz wurden bewußt hoch gewählt und lagen im μM -Bereich (max. 33 μM).

5.2.2 PCR

Polymerase-Ketten-Reaktionen (polymerase chain reaction, PCR) wurden üblicherweise unter Verwendung des *Expand High Fidelity PCR Systems* durchgeführt und enthielten 0,4 ng/ μl Template, jeweils 300 nM Primer, 200 μM dNTP, 1,5 mM MgCl₂ und 0,028 U/ μl HiFi-Polymerase Mix bei einem Volumen von 25 oder 50 μl . Bei Verwendung des Robocyclers wurde das Volumen pro Gefäß auf 25 μl begrenzt – ggf. durch Aliquotieren größerer Volumina.

5. MATERIAL UND METHODEN

Typisches PCR-Programm mit 25-35 Zyklen:

initialer Denaturierungsschritt	95 ° C 1 min
Denaturierung	95 ° C 45 sec - 1 min
Annealing, je nach Primer	50-60 ° C, 45 sec - 1 min
Elongation, je nach Polymerase	68 ° C oder 72 ° C, ca. 1 min pro kb
finale Polymerisation	68 ° C oder 72 ° C, 7 min
Parkposition	6 ° C bzw. 4 ° C

5.2.3 Gelelektrophoretische Analyse von DNA

Agarose-Gele wurden durch Aufkochen von Agarose in TAE-Puffer hergestellt und gegossen. Für große DNA-Fragmente (ab 2.000 bp) wurde eine Agarose-Konzentration von 0,8 % (w/v), für mittlere Fragmente (1.000-2.000) 1 % und für kleinere Stücke 1,5 % gewählt. Die DNA wurde vor dem Auftragen mit 1/5 Volumen DNA-Probenpuffer versetzt, und auf jedes Gel wurde ein Größenstandard mit aufgetragen. Die Elektrophorese verlief in TAE-Puffer bei 80-100 V. Zur Identifizierung der DNA wurden die Gele anschließend in Ethidiumbromid gefärbt und auf einem UV-Tisch beobachtet bzw. fotografiert.

5.2.4 Präparation und Reinigung von Nukleinsäuren

Präparation von Plasmiden Zur Präparation von Plasmiden wurden je nach Maßstab die verschiedenen Qiagen-Kits (Mini, Midi oder Maxi) verwendet. Die Isolierungen wurden anhand der Herstellerprotokolle (alkalysche Lyse, Hydroxyapatit-Säulen) durchgeführt, wobei die Plasmid-DNA am Ende in 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 aufgenommen und bei -20 ° C gelagert wurden.

Gel-Extraktion von DNA aus Agarose- und Polyacrylamid-Gelen Für Oligonukleotid-Reinigungen wurde ein 0,8 mm dickes Polyacrylamid-Gel nach folgendem Rezept gegossen:

denaturierende TBE-PAGE zur Oligoreinigung

10x TBE-PAGE Puffer	3,0	ml
Harnstoff	12,6	g
Acrylamid Gel40	11,25	ml
mit H ₂ O auffüllen auf	30	ml
TEMED	15	µl
APS	38	µl
	30	ml

Die aufzureinigenden Oligonukleotide wurden vor dem Auftragen mit dem 1,4-fachen Volumen ssDNA-Ladepuffer versetzt, 5 Min. auf 100 ° C erhitzt und dann auf Eis abgeschreckt. Die Rückgewinnung der Nukleinsäuren aus dem Gel erfolgte durch Elektroelution oder *crush & soak*.

Identifizierung von Banden

- Auf *Agarose-Gelen* wurde jeweils eine Referenzspur mit wenig Material und eine präparative Spur mit viel Material aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde die Referenzspur abgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und auf dem UV-Tisch die Bandenposition ermittelt. Das Ausschneiden der Banden aus der präparativen Spur erfolgte dann ohne Färbung und ohne UV-Bestrahlung.
- *TBE-PAA-Gele* zur Oligonukleotidreinigung wurden mit einer einzigen präparativen Spur gefahren (150 V konstant) und nach der Elektrophorese auf eine mit Folie abgedeckte, fluoreszente Dünnschichtchromatographieplatte gelegt, um die Banden unter UV-Licht mit einem Skalpell ausschneiden zu können (*UV-shadowing*).

Qiaquick Gel-Extraction Spin Kit

Mit Hilfe dieses Kits wurde dsDNA nach Herstellerprotokoll aus Agarose-Stückchen isoliert. Zur Elution der DNA von den Zentrifugiersäulen wurden 30 µl H₂O verwendet.

Elektroelution

Diese Methode wurde zur Elution von ssDNA oder dsDNA aus PAA- oder Agarose-Gelen angewandt. Nach Befüllen der Salzfallen der Elektroelutionskammern mit je 70 µl Hochsalzpuffer wurden die zerkleinerten Gelstücke in die Ausbuchtungen gegeben und 1 Std. bei einer Spannung von 150 V in Elektroelutionspuffer eluiert. Die Nukleinsäuren konnten anschließend aus dem Hochsalzpuffer durch Zugabe von zwei Volumen Ethanol gefällt werden.

crush & soak

Bei der *crush & soak* Methode wurden Gelstückchen mit 0,3 M NaCl Lösung versetzt und über Nacht bei 4 ° C geschwenkt. Anschließend wurden die Gelreste abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß gegeben und die DNA direkt durch Zugabe des zweifachen Volumens Ethanol gefällt.

Fällung von Nukleinsäuren Die Fällung von Nukleinsäuren erfolgte üblicherweise nach Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und zwei Volumen Ethanol auf Eis oder bei -20 ° C (auch über Nacht). Anschließend wurde 30 Min. bei 4 ° C und Höchstdrehzahl (14.000 U/min) zentrifugiert, der Überstand abgenommen und noch einmal mit 100 µl 70 % Ethanol gewaschen (10 Min. Zentrifugation). Nach dem Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet an der Luft getrocknet und in einem kleinen Volumen Puffer oder H₂O aufgenommen.

5. MATERIAL UND METHODEN

Qiaquick PCR-Purification Kit PCR-Reaktion wurden direkt mit dem Qiaquick PCR Purification Kit aufgereinigt. Das Protokoll des Herstellers wurde in sofern abgeändert, als die Elution mit H₂O und nicht mit dem mitgelieferten Elutionspuffer erfolgte.

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte mittels UV-Absorption unter Annahme einer Konzentration von 35 µg/ml für einzelsträngige DNA (ssDNA) und 50 µg/ml für doppelsträngige DNA (dsDNA) jeweils für einen Absorptionswert von 1 bei einer Küvettenlänge von 1 cm. Für die Umrechnung von Massenkonzentrationen in Molkonzentrationen wurde je Base ein Wert von 330 g/Mol zugrunde gelegt.

5.2.5 Enzymatische Modifikationen von DNA

Restriktions-Verdau von Nukleinsäuren Endonukleolytische Spaltung von Nukleinsäuren wurde unter Einsatz von 2-4 U Restriktionsendonuklease pro µg DNA im zugehörigen Puffer und bei der vom Lieferanten angegebenen Temperatur (in fast allen Fällen 37 °C) für mind. 1 Std. durchgeführt. Das Volumen der Ansätze wurde so groß gewählt, dass die aus der Enzym-Stocklösung resultierende finale Glycerolkonzentration unter 5% lag und somit Inhibitionen und „Star-Aktivitäten“ ausgeschlossen werden konnten.

Ligation Für Ligationsreaktionen wurden zwei verschiedene molare Verhältnisse von Insert zu Vektor (3:1 und 5:1) sowie eine Kontrolle ohne Insert angesetzt. Die Reaktionen enthielten 100 fmol Vektor und 400 U T4-DNA Ligase, und wurden im zugehörigen Reaktionspuffer (inkl. ATP) durchgeführt. Das Volumen wurde so niedrig wie möglich, jedoch für alle drei Ansätze gleich gehalten. Die Ligation erfolgte bei 16 °C über Nacht. Zur Vorbereitung auf die Transformation wurden die Ansätze gefällt und in 5 µl H₂O aufgenommen.

Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA Die 5'-Phosphorylierung von 500 nM Oligonukleotiden wurde mit Hilfe von 3 units T4-Polynukleotid-Kinase für 20 min bei 37 °C vorgenommen, wobei der mitgelieferte Puffer final 0,5 mM ATP enthielt. Anschließend wurde das Enzym 20 min bei 65 °C inaktiviert. Bei komplementären Oligonukleotiden wurde die Phosphorylierung und die Hybridisierung im gleichen Gefäß direkt nacheinander durchgeführt. Zur Dephosphorylierung von DNA wurde alternativ SAP (shrimp alkaline phosphatase) oder CIAP (calf intestine alkaline phosphatase) verwendet im zugehörigen Puffer verwendet.

5.2.6 Sequenzierung

Zur Probenvorbereitung für Sequenzierungen in der Abteilung wurden 20 μl Reaktionen mit 8 μl Premix, 600 ng Plasmid-DNA und 10 pmol Primer angesetzt. Das Temperaturprofil für die *dye-terminator-cycle-sequencing* Reaktion bestand aus 25 Zyklen mit jeweils 30 sec 96 ° C, 15 sec 50 ° C und 4 min 60 ° C. Anschließend wurden die Proben gefällt und getrocknet.

Alternativ wurden Sequenzierungen auch als Auftrag vergeben (SeqLab, Göttingen) wobei für HotShot-Sequenzierungen jeweils 7 μl Probe mit 600 ng Plasmid-DNA und 20 pmol Primer eingereicht wurden.

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit dem Staden-Paket, wobei eine Konsensus-Sequenz aus überlappenden Sequenzen erstellt wurde. Die erhaltenen Konstrukte wurden mit den erwarteten Sequenzen unter Zuhilfenahme des DNasis-Programms verglichen.

5.3 Arbeit mit Mikroorganismen

5.3.1 Herstellung elektrokompetenter *E. Coli*

Die Herstellung von elektrokompetenten *E. coli* beruht im wesentlichen auf der Entfernung von Salzen durch intensives Waschen. Von einer Kolonie XL1-blue oder BL21(DE3) wurde eine Übernachtskultur in 10 ml LB inokuliert und bei 37 ° C geschüttelt. Im Falle von XL1-blue enthielten alle Medien final 10 $\mu\text{g/ml}$ Tetracyclin. Am nächsten Tag wurde die Übernachtskultur als Inokulum für 1 L LB-Medium verwendet und die logarithmische Phase bis zu einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von etwa 0,6 verfolgt. Anschließend wurde die Kultur 15 min bei 4 ° C gehalten und die Bakterien dann 15 min bei 4 ° C und 2700xg abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 L eiskaltem, sterilen $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ resuspendiert und erneut pelletiert. Der Waschschritt wurde mit 500 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ wiederholt, bevor die *E. coli* in 20 ml steriler 10 % (v/v) Glycerinlösung resuspendiert wurden. Nach erneuter Sedimentierung wurde eine Bakteriensuspension in 2 ml steriler 10 % (v/v) Glycerinlösung hergestellt und in 50 μl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 ° C.

5.3.2 Transformation von *E. coli*

Plasmid-DNA wurde im Elektroporationsverfahren in *E. coli* gebracht. Dazu wurde ein Aliquot elektrokompetenter Bakterien auf Eis von -80 ° C aufgetaut und mit 2 μl eines Ligationsansatzes bzw. 2 μl einer 2,5 ng/ μl Plasmidlösung versetzt. Das Gemisch wurde in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette mit (0,2 cm Spalt) gegeben und einem Puls von 2500 V ausgesetzt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension in 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikum überführt und 1 Std. bei 37 ° C geschüttelt. Üblicherweise wurden auf zwei Agar-Platten mit Selektionsantibiotikum 10 bzw. 90 % der Bakterien ausplattiert und über Nacht bei 37 ° C inkubiert.

5. MATERIAL UND METHODEN

5.3.3 Identifizierung von positiven Klonen

Die Kolonien wurden zunächst mittels Kolonie-PCR auf positive Klone analysiert; meistens wurden 10 Kolonien getestet. Dafür wurde pro Kolonie ein 10 μ l PCR-Ansatz mit 100 μ M dNTPs, je 250 nM Primer und 0,025 U/ μ l Taq-Polymerase vorbereitet, der dann mit wenig Bakterienmaterial aus der Kolonie angeimpft wurde. Die PCR-Bedingungen waren 94 ° C für 1 min, danach 20 Zyklen mit jeweils 94 ° C 45 sec, 45 ° C 1 min, 72 ° C 3 min, und schließlich ein finaler Elongationsschritt bei 72 ° C für 7 min. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Von positiven Klonen wurden dann 5 ml LB-Übernachtskulturen mit Selektionsantibiotikum inokuliert, aus denen die Plasmide mit dem Qiagen Miniprep-SpinKit isoliert wurden. Durch analytischen Restriktionsverdau wurden die Ergebnisse der Kolonie-PCR verifiziert, worauf sich die weitere Analyse mittels Sequenzierung anschloss.

5.3.4 Stammkulturen

Glycerol-Stammkulturen wurden durch Versetzen von Übernachtskulturen mit je einem Volumen Glycerol hergestellt (50 % v/v Glycerol final) und bei - 80 ° C gelagert.

5.4 Protein-biochemische Methoden

5.4.1 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese

Zum Gießen und Fahren von SDS-Polyacrylamid-Gelen kam das Mini-V-Gelsystem zum Einsatz, welches 0,8 mm dicke Spacer beinhaltet. Im Sammelgel betrug die Acrylamidkonzentration 5,7 %, und Quervernetzung sowie Polymerisationsstart wurden jeweils durch Zugabe eines 0,002-fachen Volumens an TEMED bzw. APS erreicht. Trenngele bestanden aus 12,5 % Acrylamid und wurden mit jeweils 0,0014-fachem Volumen an TEMED und APS quervernetzt bzw. polymerisiert. Beide Gele enthielten 0,1 % (w/v) SDS. Acrylamid wurde als Fertiglösung (Gel-30, Roth, Karlsruhe) bezogen und war auf 30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid eingestellt, was einem Verhältnis von 37,5:1 entspricht.

Proben für die Elektrophorese wurden in Probenpuffer für 5 min aufgekocht. Die Elektrophoresebedingungen waren 150 V konstant in SDS-Laufpuffer. Gele wurden vor dem Anfärben mit Simply-Blue-Safestain Lösung gründlich gewässert, die Entfärbung erfolgte in H₂O.

5.4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinen in Lösung wurde mit dem Coomassie-Proteinassay Reagenz (no. 23200, Pierce, Bonn) vorgenommen. Im Bereich von 2,5 bis 25 μ g/ml wurde eine Eichreihe mit BSA-Standard angesetzt. Die Messung der Absorption

erfolgte in 96-well Mikrotiterplatten im TECAN-Plattenlesegerät bei 590 nm in einem Totalvolumen von 300 μ l.

5.4.3 FLP-Rekombinase

5.4.3.1 Codon-Optimierung

Entwurf der Oligos

Ausgehend von den Sequenzdaten des Vektors pOG44 (Invitrogen, Heidelberg) wurde am Computer die codierende Sequenz des FLP-Proteins mit Hilfe des GCG-Paketes in die Aminosäuresequenz übersetzt. Bei der anschließenden „reversen Translation“ zurück auf die DNA-Ebene wurde die Codon-Tabelle von *E.Coli* zugrundegelegt und darauf geachtet, dass für jede Aminosäure immer das am häufigsten in *E.Coli* verwendete Codon eingesetzt wurde. Zur Herstellung der codon-optimierten FLP Sequenz wurden mit dem Computerprogramm *Oligo* 64 überlappende Oligodesoxyribonukleotide mit Längen zwischen 35 und 46 Basen entworfen. Die überlappenden Regionen waren zwischen 16 und 23 Nukleotide lang und wurden so ausgesucht, dass die sich Schmelztemperaturen der jeweils überlappenden Regionen in einem engen Rahmen um ca. 60 °C bewegten. Als Parameter wurden im Oligoprogramm eine Konzentration an monovalenten Ionen von 40 mM, an Mg^{2+} von 2 mM und an DNA von 250 pM eingetragen. Die Oligonukleotide wurden up1 bis up32 und low1 bis low32 benannt. Zur Einführung der Mutation Y343S wurden noch zwei weitere Oligonukleotide entworfen, die die Namen up27a und low26a bekamen.

Herstellung des Gens

Zur Synthese des Gens für die wt-Aminosäuresequenz der FLP-Rekombinase wurden die Oligonukleotide up1-up32 und low1-low32 eingesetzt, während für die Mutante Y343S die Primer up27 und low26 durch up27a und low26a ersetzt wurden. Anhand der Publikation von Stemmer [104] wurde zunächst die *gene-assembly* Reaktion (20 μ l) durchgeführt. Die 64 Oligonukleotide wurden in einer Konzentration von jeweils 45 nM eingesetzt, die finale dNTP-Konzentration betrug je 200 μ M, und der Ansatz enthielt Taq und Pfu zu 0,05 U/ μ l bzw. 0,001 U/ μ l in Gensynthese-Puffer. Es wurden 55 Zyklen im Robocycler mit folgendem Temperaturprofil gefahren: 94 °C, 52 °C, 72 °C, wobei die Temperaturen jeweils für 40 Sekunden gehalten wurden. Die folgende *gene-amplification* Reaktion (100 μ l) enthielt 1/40 Volumen *gene-assembly* Ansatz, je 1 μ M der äußeren Primer up1 und low32, außerdem dNTPs, Taq und Pfu in den o.a. Konzentrationen im Gensynthese-Puffer. Die Amplifikation erfolgte mit 25 Zyklen zu jeweils 40 sec 94 °C, 40 sec 50 °C, 3 min 72 °C im Robocycler.

5.4.3.2 Expression Zur Transformation des *E.coli* Stammes BL21(DE3) mittels Elektroporation wurden 5 ng des Plasmides pET24a(+)-coFLP verwendet. Von einer Über-

5. MATERIAL UND METHODEN

nachtkultur der Transformanten auf LB-Kanamycin Platte wurden von drei Kolonien je 5 ml LB-Kan Kulturen angeimpft und die Plasmide mit dem Qiagen Miniprep Spin Kit isoliert. Durch analytischen Restriktionsverdau mit den Enzymen BamHI und Sall wurde die Existenz des Pasmides und des Inserts verifiziert. Von den drei Klonen wurde einer mit korrektem Konstrukt und hoher Plasmidausbeute ausgewählt und davon sechs Mal 100 μ l einer 1:15.000 Verdünnung der Miniprep-Kultur in LB auf sechs LB-Kan Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 ° C inkubiert. Alle Kolonien der Platten wurden mit LB-Kan abgewaschen und zur Inokulation von 4,8 L LB-Kan benutzt, worauf die Kultur bei 180 RPM und 37 ° C geschüttelt wurde. Durch Trübungsmessung bei 600 nm wurde die logarithmische Wachstumsphase bis zu einer optischen Dichte von ca. 0,6 verfolgt. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Kultur auf 23 ° C gekühlt und bei Erreichen der Temperatur mit 1 mM IPTG (final) für 2 Std. bei 23 ° C induziert. Ab dem Ende der Induktion erfolgte eine Kühlung auf Eis, und es wurden alle weiteren Schritte auf Eis oder bei 4 ° C durchgeführt. Die Abtrennung der Bakterien erfolgte durch Zentrifugation bei 4.000xg für 15 min, worauf das Pellet einmal in 60 ml eiskaltem Puffer S resuspendiert und erneut sedimentiert wurde. Nach Dekantieren des Überstandes wurden die induzierten Bakterien in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 ° C gelagert.

5.4.3.3 Reinigung und Lagerung von FLP Das Pellet einer induzierten 4,8 L Kultur wurde auf Eis aufgetaut und in 72 ml eiskaltem Puffer S resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend noch durch ein Kanüle (No. 2, grün, 0,8 mm, 21 gage) gedrückt und mit 2.400 U DNase I sowie 1 mM PMSF versetzt. Zur Zelllyse wurde die mechanische FrenchPress-Methode benutzt, bei der die Bakterien-Suspension durch einen schmalen Spalt bei hohem Druck gepresst wird. Bei der verwendeten 20k-cell wurde bei der Druckeinstellung *high* auf der Geräteskala ein Wert von 500 eingestellt, was in etwa einem Druck von 6.000 PSI entspricht. Das Lysat wurde in eisgekühlten Gefäßen aufgefangen, bei 4 ° C und 43.000xg für 45 min zentrifugiert und der Überstand 0,2 μ m filtriert. Zur Reinigung wurde eine HiTrap Chelating Säule (1 ml) nach Herstellerangaben frisch mit Nickel beladen und an der FPLC-Anlage im Kühlraum (4 ° C) mit einem konstanten Fluss von 1 ml/min betrieben. Die Anlage verfügte über ein Durchflussphotometer im UV-Bereich mit einem Schreiber. Die Säule wurde mit Puffer A äquilibriert, bevor das Lysat geladen wurde. Nachdem das Lysat aufgetragen war, wurde mit Puffer A so lange weiter gewaschen, bis der Schreiber nahezu zur Basislinie zurückgekehrt war. Dann wurde stufenweise mit steigenden Anteilen von Puffer B eluiert. Die Schritte waren 20, 40, 80, 120 und 200 mM Imidazol. Die Fraktionen der einzelnen Elutionsstufen wurden auf dem SDS-Gel analysiert. Die Fraktionen der 200 mM Stufe wurden vereinigt, und durch langsames Zutropfen von 1/19 Vol. einer 5 M NaCl-Lösung auf 400 mM NaCl eingestellt. Zur Entfernung der DNA kam als zweiter Schritt eine Q-Sepharose fast flow Anionenaustauscher-Säule (1 ml) zum Einsatz, die in Puffer B₄₀₀ äquilibriert wurde. Die

FLP-Probe wurde auf die Säule gegeben und der Durchfluss (ca. 25 ml) weiter für die Dialyse verwendet. Die gleichzeitige Dialyse und Konzentrierung erfolgte in Dialysepuffer mit Ultrahülsen unter Vakuum in der zugehörigen Saugflasche bis zu einem Volumen ≤ 1 ml. Zur anschließenden Lagerung bei -80°C wurden kleine Aliquots pipettiert.

5.4.4 Topoisomerase II Reaktionen

Topoisomerase II Reaktion wurden in Topoisomerase II Puffer bei einem Gesamtvolumen von $30\text{ }\mu\text{l}$ in 8-well Nunc-Kammern durchgeführt. Die Konzentration der Topoisomerase II betrug 400 nM , die des Substrates 100 nM , wovon 50 nM unmarkiert und 50 nM doppelt markiert waren. Proben wurden gemischt und dann sofort für $10 \times 10\text{ sec.}$ gemessen (Wert „vorher“). Darauf folgte eine 20minütige Inkubation bei Raumtemperatur, bevor Proteinase K in einer Endkonzentration von $0,05\text{ mg/ml}$ zugegeben wurde. Die Inkubationszeit für den Verdau betrug eine Stunde bei RT. Anschließend wurden die Proben wieder gemessen (Wert „nachher“).

5.5 In vitro Translation

5.5.1 Präparation eines *E.coli* S-30 Extraktes

Die Präparation eines aktiven S-30 Extraktes erfolgte nach Lesley [67]. Als *E.coli* Stamm wurde KW-251 verwendet. Von einer 100 ml Übernacht-Starterkultur in S30-Medium wurden je 10 ml zur Inokulation von $6 \times 1\text{ L}$ Aliquots Medium eingesetzt. Diese Kultur wurde bei 37°C bis zu einer OD_{600} von $0,8$ angeschüttelt, dann auf Eis gekühlt und bei 4°C und $3.500 \times g$ für 15 min sedimentiert. Die Pellets wurden in 1 L S30-Waschpuffer resuspendiert, für 20 min abzentrifugiert, nochmals mit 1 L gewaschen und erneut pelletiert. Dieses Pellet wurde bei -80°C gelagert. Die Bakterien wurden aufgetaut, in 4 ml S30-Lysepuffer pro g Pellet resuspendiert und durch eine Kanüle ($0,8\text{ mm}$) gedrückt. Nach FrenchPress Aufschluss bei 6.000 PSI wurden DTT (1 mM final) zum Lysat gegeben und bei 4°C und $30.000 \times g$ für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein sauberes Zentrifugenröhrchen überführt und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert, woraufhin der Überstand in ein sauberes Gefäß gegeben und auf Eis gekühlt wurde. Pro $6,5\text{ ml}$ Lysat wurden 1 ml S30-Präinkubationsmix zugegeben und der Ansatz bei 25°C und 100 U/min für 60 Minuten geschüttelt. Anschließend wurde Micrococcal Nuklease (final 25 U/ml Lysat) und $\text{Ca}(\text{Acetat})_2$ (final 1 mM) zugegeben und weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Vor der Dialyse wurde EGTA in einer finalen Konzentration von 4 mM zugesetzt. Die Dialyse erfolgte in Schläuchen mit einer Ausschlussgrenze von $6.000 - 8.000\text{ Da}$ in 2 L 4°C kaltem S30-Dialysepuffer mit viermaligem Pufferaustausch in 1-h Intervallen. Der dialysierte S30-Extrakt wurde in kleinen Aliquots bei -80°C eingefroren und gelagert.

5. MATERIAL UND METHODEN

5.5.2 Optimierung des Reaktionsmix

Zur Optimierung des zum S-30 gehörigen Reaktionsmixes wurde die gekoppelte *in vitro* Transkription/Translation des grün fluoreszierenden Proteins als Reportersystem verwendet. Der Reaktionsmix wurde auf Magnesium-, Kalium- und Ammoniumkonzentration optimiert. Dazu wurden im Reaktionsmix die jeweiligen Komponenten in ihrer Endkonzentration variiert: Mg^{2+} 1-15 mM, K^+ 40-200 mM und NH_4^+ 10-50 mM. Die 50 μl Ansätze enthielten 15 μl S-30 Extrakt, 20 μl Reaktionsmix, 1,8 nM pQBI63 und 10 U T7-RNA-Polymerase. Die Inkubation und Messung der Fluoreszenz erfolgte in 96-well Mikrotiterplatten im TECAN-Plattenlesegerät bei 37 ° C mit dem 485 nm Excitationsfilter und dem 535 nm Emissionsfilter.

5.5.3 Reaktionsansätze

Die gekoppelte *in vitro* Transkription/Translation von Genen mit T7-Promotor erfolgte in 50 μl Ansätzen. Typischerweise waren 15 μl S-30 Extrakt, 20 μl Reaktionsmix und 10 U T7-RNA-Polymerase enthalten. Die Template-Konzentration wurde im unteren nanomolaren Bereich gehalten.

5.6 Emulsionen

Die Ölphase der Emulsionen wurde durch Lösen der Detergenzien Span80 (4,5 % (v/v)) und Tween80 (0,5 % (v/v)) in Mineralöl hergestellt. Übliche Emulsionsansätze enthielten 50 μl wässrige Phase und 950 μl Ölphase. Der Emulgierprozess erfolgte im 2 ml Eppendorfgefäß auf Eis durch 10 sec Ultra-Turrax Behandlung mit einer Geräteeinstellung von Stufe 5, was in etwa einer Drehzahl von 21.000 U/min entspricht.

5.6.1 Bestimmung der Größenverteilung

Zur Bestimmung der Größenverteilung der Mineralöl-Emulsionen durch Laser-Scan-Mikroskopie wurde als wässrige Phase eine etwa 500 nM Alexa488-Lösung verwendet. Zwei Mikroliter der Emulsion wurden in eine Thomakammer (5 μm) gegeben und mit einem gewöhnlichen Deckglas (Stärke 1) abgeschlossen. Es wurden 10 Scan-Aufnahmen von 2.048 x 2.048 Pixeln Größe in einem z-Abstand von je 1 μm gemacht und die Daten im Windows-Bitmap-Format exportiert. Mit Hilfe des Programms ScionImage wurden die Bilddaten eingelesen und alle Schichten zu einem Mittelwertbild vereinigt. Durch das Setzen eines Schwellenwertes wurde das Bild in das binär-Format umgewandelt, bevor die Partikelanalyse-Routine der Software gestartet wurde. Die ausgegebenen Flächeninhalte wurden von Quadratpixeln in μm^2 mit einem Wert von 0,11 μm pro Pixel umgerechnet. Die weitere statistische Verarbeitung der Daten erfolgte in Origin, wobei die Flächen unter Annahme einer Kreisform in Volumina umgerechnet wurden.

5.6.2 Rückgewinnung von DNA aus Emulsionen

Zur Extraktion von DNA aus Emulsionen wurde die Wassertröpfchen durch 1 min Zentrifugation bei Höchstdrehzahl in der tischzentrifuge sedimentiert. Der Ölüberstand wurde abgenommen und das Pellet bei einem angenommenen Volumen von 150 μ l mit dem Qiaquick PCR-Purification-MiniElute-Kit verarbeitet. Die Elution der Säulen erfolgte mit 10 μ l Puffer EB aus dem Kit.

5.6.3 Detektions-PCR

Die Amplifikation von Rekombinations-Produkten erfolgte mit dem Expand High Fidelity PCR System. Als Primer wurden Ev4FLP1 und Ev4FLP2 verwendet. Die PCR-Bedingungen waren 95 °C, 1 min, 30 \times (95 °C, 45 sec / 55 °C, 45 sec / 68 °C, 2 min 40 sec), 68 °C 7 min im Robocycler bei einem Volumen von 25 μ l.

5. MATERIAL UND METHODEN

6 Projekt A: FLP-Rekombinase

Bedarf an neuen Rekombinasen

In der Natur dient die Rekombination von DNA der Erzeugung von Variabilität und Heterogenität innerhalb von Populationen und hat damit eine besonders wichtige Rolle für Evolutionsprozesse [83]. Vorteil der Durchmischung von genetischem Material ist die Möglichkeit, mehrere sich positiv auswirkende Mutationen auf ein und demselben Gen zu vereinigen. Nicht nur für ganze Populationen, sondern auch bei DNA-Reparaturmechanismen innerhalb einzelner Zellen ist der Austausch von DNA und damit die Rekombination ein entscheidendes Element [113].

Für die Applikation von Rekombinationssystemen in Molekularbiologie und Genetik sind vor allem Rekombinasen mit definierten Erkennungssequenzen (sog. site-spezifische R.) von Interesse. Der Bedarf an DNA-Rekombinasen als neue molekularbiologische Werkzeuge ist dabei steigend. Mit Beginn der Entwicklung von genetischen Manipulationen wurden meist kleinere Fragmente ausgetauscht, wofür Restriktionsendonukleasen schon früh zur Verfügung standen. Die Produktpalette an unterschiedlichen Restriktionsenzymen ist heute sehr groß. Jedoch geht der Trend – nicht zuletzt durch die Aufklärung der Genome verschiedener Organismen – hin zur Manipulation größerer Genomabschnitte. Dafür kommen klassische Restriktionsenzyme kaum mehr in Frage, da ihre Erkennungssequenzen oft kurz sind und damit die Wahrscheinlichkeit des Auftretens mit steigender Länge des DNA-Abschnittes stark zunimmt. Hinzu kommt, dass vielfach ein direkter Austausch von großen Fragmenten gewünscht wird. Für *in vivo* Fragestellungen wie z.B. in der Mausgenetik ist daher die Verfügbarkeit von Rekombinasen mit neuen Erkennungssequenzen von besonders großem Interesse. Dies gilt nicht nur hinsichtlich der Forschung sondern auch als Fernziel für gentherapeutische Ansätze.

Mit der Entwicklung eines Systems zur gerichteten Veränderung der Substratspezifität von Rekombinasen eröffnet sich ein sehr großes Anwendungspotenzial. Wenn es gelingt, site-spezifische Rekombinasen auf vorgegebene Zielsequenzen hin zu trimmen, entstehen wertvolle neue molekularbiologische Werkzeuge. Für die experimentelle Realisierung eines solchen Vorhabens der Adaption von Enzymen an gewünschte Funktionen eignen sich evolutive Ansätze besonders gut. Basis für die Anwendung der evolutiven Biotechnologie zur Generierung neuer Rekombinasen sind geeignete Konzepte zur Selektion von veränderten Varianten dieser DNA modifizierenden Proteine.

Für die im Rahmen von Evolutionsexperimenten notwendige Selektion von – hinsichtlich ihrer Substratspezifität – neuen FLP-Varianten wurden in dieser Arbeit drei Strategien realisiert. Alle dieser Ansätze sind für ein durchgehendes Arbeiten *in vitro* ausgelegt. Dadurch ergeben sich gegenüber in der Literatur beschriebenen *in vivo* Ansätzen (FLP-

6. PROJEKT A: FLP-REKOMBINASE

Rekombinase: [15, 115]; Cre-Rekombinase: [92]) erhebliche Vorteile wie höherer Probandurchsatz und bessere Kontrollierbarkeit der Selektionsbedingungen.

Die drei hier aufgebauten Systeme lassen sich wie folgt untergliedern:

- Die beiden Assays für eine **Selektion durch Screening** verwenden Fluoreszenz als sensitives Messsignal:
 - Das erste System wurde zur Beobachtung von DNA-Rekombination mit **Zweifarben-FCS** entwickelt. Die Prinzipien und die Herstellung der dazugehörigen kreuzkorrelierenden Substrate werden unter Punkt **6.3** gezeigt, und die Messergebnisse werden im Abschnitt **6.4** beschrieben.
 - Ein weiterer Ansatz für die Messung von Rekombination basiert auf **FRET** (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) und wird im Kapitel **6.5** vorgestellt.
- Im Gegensatz zu den beiden ersten Systemen, die für Screening-Anwendungen konzipiert wurden, konzentriert sich die dritte Strategie auf die **Selektion durch Genotyp-Phänotyp-Kopplung**. Das Prinzip und die einzelnen Komponenten dieses Systems sowie die experimentelle Überprüfung sind Gegenstand des Abschnittes **6.6**

6.1 Eigenschaften der FLP-Rekombinase

FLP-Rekombinase ist ein monomeres Protein aus Hefe mit einem Molekulargewicht von 48 kDa, welches an einer definierten Erkennungssequenz die Rekombination zweier DNA Doppelstränge katalysiert [91]. Die auch als **FLP-Recognition-Target (FRT-site)** bezeichnete Erkennungssequenz (Abb. 10a) besteht aus den drei Symmetrieelementen a, b und c sowie einer 8 bp langen, zentralen core-Region, welche der gesamten site eine Orientierung gibt. Das dritte Symmetrieelement c ist zur Rekombination nicht notwendig [85], so dass eine 34 bp lange FRT-site funktionell aktiv ist.

Nachdem jeweils zwei FLP an eine Erkennungsstelle gebunden haben, finden sich die Partner-DNA-Stränge durch Protein-Protein-Wechselwirkungen zusammen und bilden nach Biegung der DNA eine planare Holliday-Struktur aus. In diesem Komplex sorgen vier FLP-Monomere für die eigentliche Rekombination, die in zwei Schritte zu untergliedern ist. Zu Beginn greift auf jedem Strang ein FLP-Monomer *trans-horizontal* mit der OH-Gruppe des Tyrosin-Restes 343 die Phosphodiesterbindung der DNA direkt neben der core-Region nukleophil an (Abb. 10b), was gut funktioniert, da das direkt danebenliegende FLP-Molekül die entsprechende Umgebung bereitstellt. Durch die so entstehenden Phosphotyrosyl-Bindungen wird die Energie während der dann folgenden Konformationsänderung konserviert bis die freien 5'-OH der jeweils anderen DNA nukleophil angreifen, was zur Ligation und damit zum Austausch des ersten Stranges führt. Im zweiten Schritt tauschen die FLP ihre Rollen: die bisher aktiven Monomere stellen jetzt die Umgebung für den nukleophilen Angriff bereit, während die anderen beiden FLP-Monomere nun nukleophil angreifen. Der gesamte Prozess ist unabhängig von ATP-Verbrauch oder anderen Co-Faktoren.

Bei der Rekombination werden die FRT-sites, anhand ihrer durch die core-Region vorgegeben Orientierung, parallel aneinander gebracht. Die Sequenz der core-Region ist für die Rekombination nicht von Bedeutung, solange die beiden Partner-FRT-sites dieselbe Sequenz innerhalb der core-Region besitzen [101]. *Inter-* und *intramolekulare* Rekombinationen sind möglich (Abb. 11). Hat die 8 bp lange core-Region eine palindromische Sequenz, so besitzt die gesamte FRT-site keine Orientierung, was zu ungerichteten Rekombinationen führt.

6. PROJEKT A: FLP-REKOMBINASE

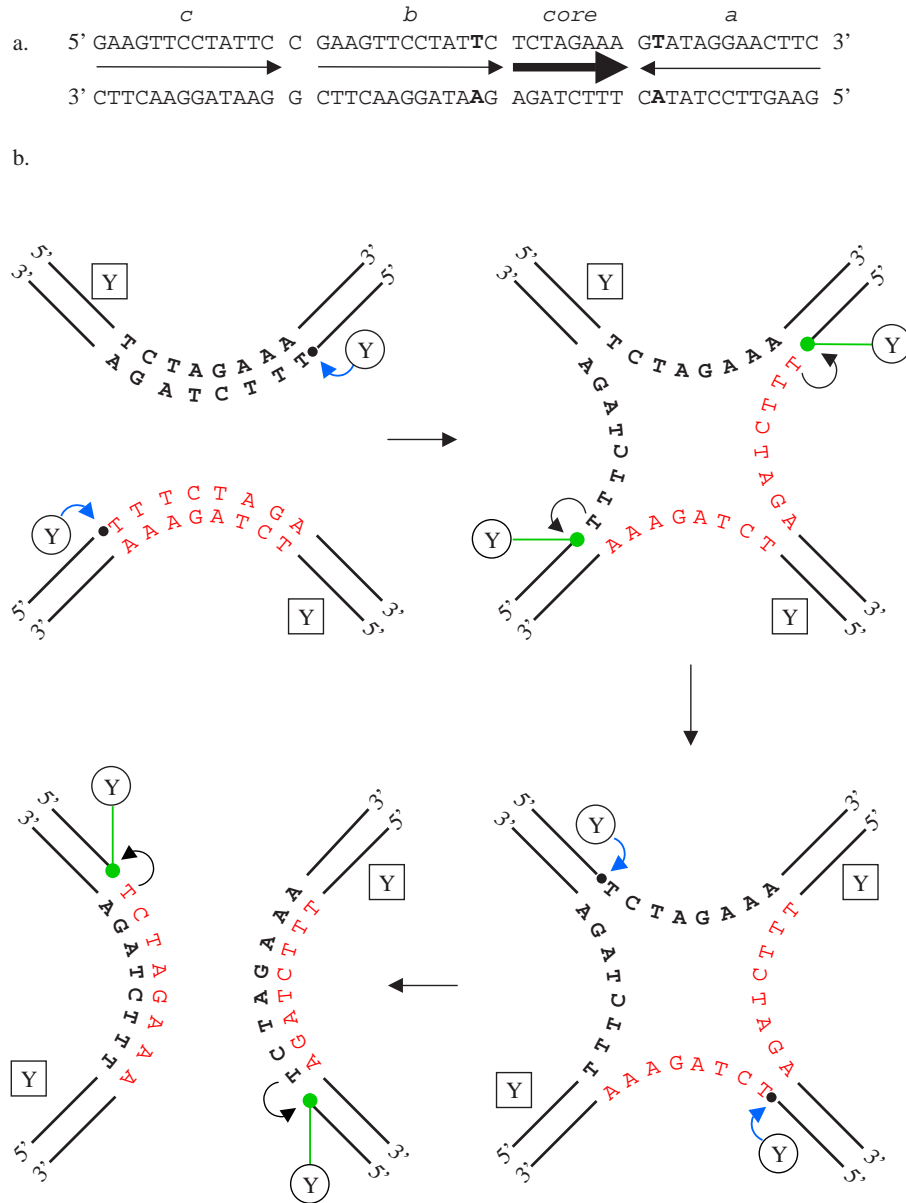


Abbildung 10: **Mechanismus der Rekombination durch FLP**

a: Erkennungssequenz der FLP-Rekombinase. Die Symmetrie ist an den fett markierten Stellen nicht ganz perfekt. **b:** Die katalytisch aktiven Tyrosin-Reste der FLP-Rekombinase sind mit Y symbolisiert, wobei ein Kreis die momentanen aktiven FLP-Monomere bezeichnet und ein Quadrat die jeweils inaktiven. Blaue gebogene Pfeile symbolisieren den nukleophilen Angriff von Y auf Phosphodiesterbindungen der DNA, und gebogene schwarze Pfeile zeigen den nukleophilen Angriff auf Phosphotyrosylbindungen durch freie 5'-OH der DNA Enden. Die Phosphatgruppen sind durch Punkte angedeutet, Phosphotyrosylbindungen durch grüne Linien.

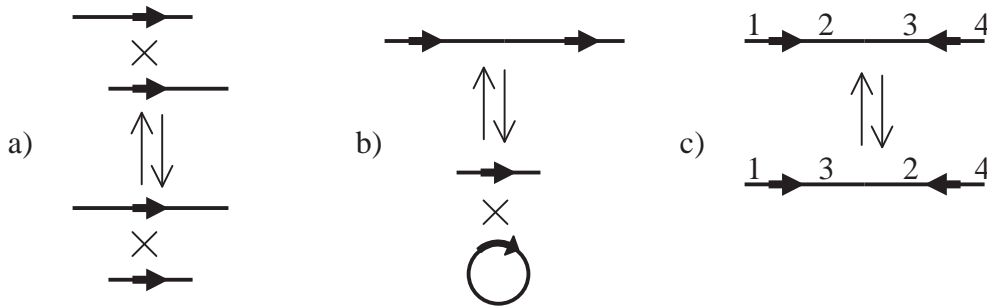


Abbildung 11: **inter- und intramolekulare Rekombinationsmöglichkeiten**

Die Rekombination kann sowohl als intermolekulare (a) als auch als intramolekulare Reaktion ablaufen, wobei bei letzterer je nach Orientierung der FRT-sites Excision (b) und Inversion (c) unterschieden werden können.

6.2 Gewinnung von FLP

6.2.1 Codon Optimierung des FLP-Gens

Im universellen genetischen Code werden zur Codierung von Aminosäuren Tripletts verwendet, an deren drei Positionen je vier Basen stehen können. Damit ergeben sich $4^3 = 64$ Codierungsmöglichkeiten, welche in der Natur für 20 Aminosäuren und je ein Start- und Stop-Codon genutzt werden. So entstehen zwangsläufig Redundanzen, die dazu führen, dass für fast jede Aminosäure mehrere Codons zur Verfügung stehen. Die bevorzugte Verwendung variiert dabei stark zwischen verschiedenen Organismen wie Hefe und *E.coli*. Kommen sehr seltene Codons in Genen vor, so verursachen diese bei der Translation Probleme und wirken zum Teil wie ein Stop-Codon [54], da das Ribosom anhält und auf eine passende tRNA wartet. Auch kann es dabei zum Überspringen einzelner Codons kommen. Das Gen der FLP-Rekombinase stammt aus Hefe und wurde zur Expression in *E.coli* verwendet. Dabei stellte sich heraus, dass die Expressionsrate äußerst niedrig ist. In der Literatur finden sich Protokolle [3, 72], die z.B. die Expression von FLP in einem Fermenter mit 400 L Medium beschreiben und eine Ausbeute von 2 mg FLP aus 100 g Zellpaste angeben. Experimente, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, erbrachten zunächst keine messbare Expression von FLP in *E.coli* bei Kulturvolumina im unteren Literbereich (Daten nicht gezeigt). Ansätze, durch moderne kommerzielle Expressionssysteme mit starken Promotoren die Menge an mRNA zu erhöhen, führen besonders in das Dilemma der seltenen Codons, da dann die sehr geringe Konzentration einiger tRNAs einer großen Menge an mRNA gegenübersteht und so die Wahrscheinlichkeit, eine vollständige Polypeptidkette kompletter Länge zu synthetisieren, äußerst gering ist.

Es stellte sich heraus, dass von den 423 Codons des FLP-Gens insgesamt 44 Codons

6. PROJEKT A: FLP-REKOMBINASE

Codon	Aminosäure	Häufigkeit in <i>E.coli</i> K12	Häufigkeit in <i>Saccaromyces</i> <i>cerevisiae</i>	Vorkommen im FLP-Gen
AGG	Arg	0,12 %	0,93 %	7x
AGA	Arg	0,21 %	2,13 %	7x
AUA	Ile	0,44 %	1,78 %	17x
CUA	Leu	0,39 %	1,34 %	9x
CGA	Arg	0,36 %	0,30 %	2x
CGG	Arg	0,54 %	0,17 %	1x
CCC	Pro	0,55 %	0,68 %	1x

Tabelle 8: *seltene Codons in E.coli*

in *E.coli* als äußerst seltene Codons eingestuft werden können (Verwendungshäufigkeit geringer als 0,6 %, vgl. Tab. 8). Um dennoch akzeptable Mengen an aktivem FLP-Protein in *E.coli* exprimieren zu können, wurde die einzelnen Codons des FLP-Gens an die Verwendungshäufigkeit in *E.coli* angepasst, ohne die Aminosäuresequenz des Proteins zu verändern. Zur Umwandlung aller Codons auf das jeweils am häufigsten verwendete Triplet wurde eine von Stemmer 1995 publizierte Methode herangezogen [104], mit der mittels PCR viele überlappende Oligonukleotide zu einem langen DNA-Stück zusammengesetzt werden können (vgl. Abb. 12). Bei dieser Prozedur sind auch gezielte Mutationen durch den Austausch einzelner Oligonukleotide sehr einfach möglich. So wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht nur das Gen für FLP mit der wt-Aminosäuresequenz, sondern sogar auch eine katalytisch inaktive Mutante FLP-Y343S erzeugt. Das PCR-Produkt der *gene-amplification* Reaktion wurde mit dem Zero-Blunt-Kit subkloniert (Konstrukt pCR-BluntII-coFLP) und sequenziert. Die codon-optimierte Variante des FLP-Gens wird im folgenden coFLP genannt, während die inaktive Mutante als coFLP-Y343S bezeichnet wird. Bei dieser Mutante wird die katalytisch wichtige Aminosäure Tyrosin an Position 343 gegen Serin ausgetauscht.

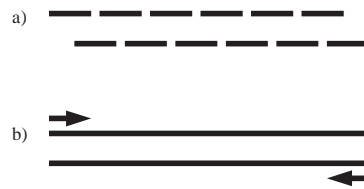


Abbildung 12: **Prinzip der Gen-Synthese**

a: gene-assembly Reaktion: Überlappende, synthetische Oligonukleotide werden äquimolar gemischt und einer PCR-Reaktion unterzogen. **b:** gene-amplification Reaktion: Nach Zugabe der beiden äußeren Primer wird das vollständige Konstrukt durch erneute PCR amplifiziert.

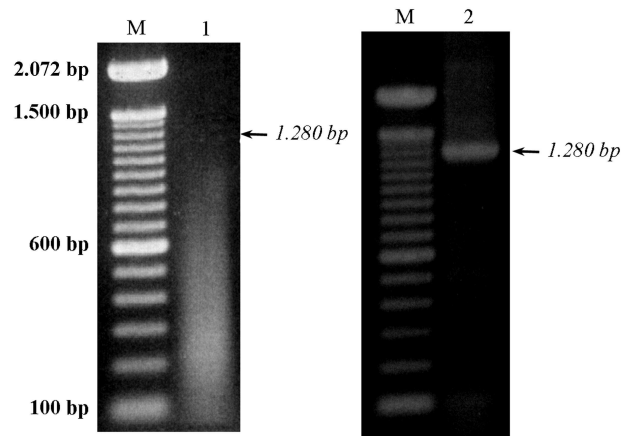


Abbildung 13: **Codon-Optimierung des FLP-Gens**

1: Die gene-assembly Reaktion erbringt nach 55 PCR-Zyklen auf eine Mischung der 64 Oligonukleotide up1-up32/low1-low32 zunächst noch nicht das erwartete 1.280 bp Produkt. **2:** Die weitere Amplifikation eines Aliquots (1:40 Verd.) des gene-assembly Ansatzes mit den äußeren Primern up1 und low32 ergibt dann in der gene-amplification Reaktion das 1.280 bp lange FLP-Gen. **M:** 100 bp Marker

6. PROJEKT A: FLP-REKOMBINASE

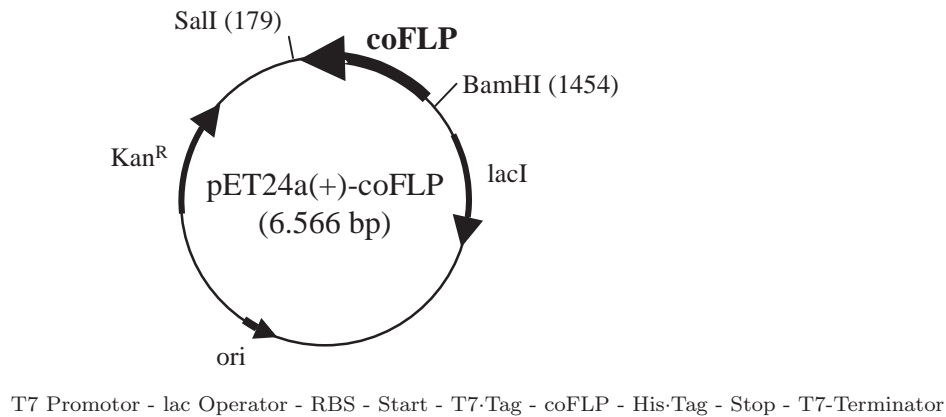


Abbildung 14: **Expressionsvektor für FLP**

oben: Karte des pET24a(+)-coFLP Vektors; **unten:** Die Organisation des FLP-Gens im Expressionskonstrukt; RBS: Ribosomen-Bindungsstelle

6.2.2 Expression und Aufreinigung der FLP-Rekombinase

Die Strategie zur Expression der FLP-Rekombinase basierte auf dem pET-System, bei dem die zu exprimierenden Gene unter Kontrolle eines T7-Promotors gestellt werden, welcher durch lacI reprimiert wird. Kombiniert werden diese Vektoren mit dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3), welcher die T7-RNA Polymerase unter Kontrolle des lacUV-Promotors exprimiert. Durch Induktion mit IPTG wird sowohl der T7-Promotor freigegeben als auch die Menge an T7-RNA-Polymerase erhöht. Auf diese Weise ergeben sich hohe Expressionsraten.

Als Expressionsvektor kam hier der pET24a(+) Vektor zum Einsatz, in den das coFLP-Gen über BamHI und Sall insertiert wurde. Als Template für die Generierung des coFLP-Inserts mittels PCR wurde das Konstrukt pCR-BluntII-coFLP verwendet, wobei die Restriktionsschnittstellen durch die Primer KF-FLP-BamHI und KR-FLP-Sall eingeführt wurden. Dieses Konstrukt erzeugt ein Fusionsprotein mit sechs Histidinen am C-Terminus (His-Tag), was zur Reinigung mittels Affinitätschromatographie benutzt werden kann. Die Expression des FLP-Proteins in BL21(DE3) erfolgte wegen der bedingten Thermostabilität des Enzyms bei Raumtemperatur (FLP stammt ursprünglich aus Hefe). Die anschließende Aufreinigung der FLP erfolgte an der FPLC-Anlage mit Hilfe einer Nickel-Chelat-Säule, welche den His-Tag bindet. Nach Stufenelution mit steigenden Imidazol-konzentrationen zeigte die Analyse der Fraktionen auf dem SDS-Gel eine Bande von der korrekten Größe (52,3 kDa) bei 200 mM Imidazol.

Diese Fraktion wurde noch mit einem Anionentauscher von DNA befreit, wobei das FLP-Protein im Gegensatz zur DNA aufgrund seines isoelektrischen Punktes (pI) von 9,68 bei pH 7,4 positiv geladen ist und nicht bindet. Besonders kritisch für die Erhal-

6. PROJEKT A: FLP-REKOMBINASE

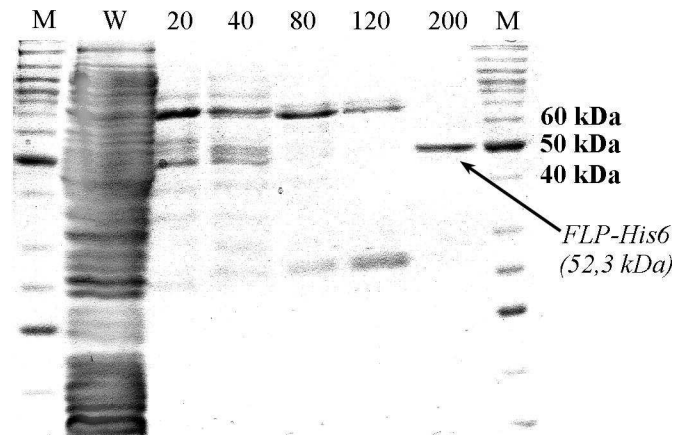


Abbildung 15: **Die Fraktionen der FLP-Aufreinigung**

M: BenchMark-Größenstandard; W: Waschfraktion; die Zahlenangaben bezeichnen die Konzentration an Imidazol in mM

tung der Rekombinations-Aktivität scheint die Salzkonzentration zu sein. FLP toleriert 150 mM NaCl, wenn noch DNA in der Lösung enthalten ist, während das Protein nach Entfernen der DNA unterhalb von 400 mM NaCl präzipitiert [49]. Dem wurde Rechnung getragen durch Erhöhung der NaCl-Konzentration vor dem Anionenaustausch-Schritt. Desweiteren wurde festgestellt, dass die Konzentrierung der FLP-Rekombinase mittels zentrifugierbaren Ultrafiltrationseinheiten und anschließender Dialyse zur Inaktivierung führt. Aktives Protein konnte durch Verwendung von Ultrahülsen (sog. Dialysefinger) erhalten werden, welche parallel Konzentrierung und Dialyse unter Vakuum ermöglichen. Die Konzentration des homogen reinen FLP-Proteins lag bei ca. 0,9 mg/ml, insgesamt konnten aus 4,8 L Kultur ca. 800 μ g FLP-Protein gewonnen werden, was die Erfolg der codon-Optimierung zeigt. Bezüglich der Lagerbedingungen wurde herausgefunden, dass entgegen den Angaben von [73] eine bei 0-4 °C gelagerte Charge sehr schnell ihre Aktivität verlor. Lagerung bei -20 °C in Puffer mit 50% Glycerin führte ebenfalls nach kurzer Zeit zur Inaktivierung. Einzig die Lagerung bei -80 °C in 10% Glycerin konnte die Aktivität über mindestens zehn Monate erhalten, wobei wenigstens zwei Einfrier-/Auftauzyklen ohne nennenswerten Aktivitätsverlust möglich sind.

6.2.3 Klassischer Aktivitätsnachweis für FLP-Rekombinase

Zum Nachweis von Rekombinationsaktivität wurde für die gelelektrophoretische Analyse ein intermolekulares Assay mit linearen Substraten entworfen. Die Edukte haben die gleiche Länge, tragen jedoch die FRT-site in unterschiedlicher Orientierung. Auf diese Weise ergeben sich bei erfolgreicher Rekombination zwei Produkte, eines mit etwa der doppelten Länge der Edukte, und ein sehr kurzes (vgl. Abb. 11a). Die elektrophoreti-

6. PROJEKT A: FLP-REKOMBINASE

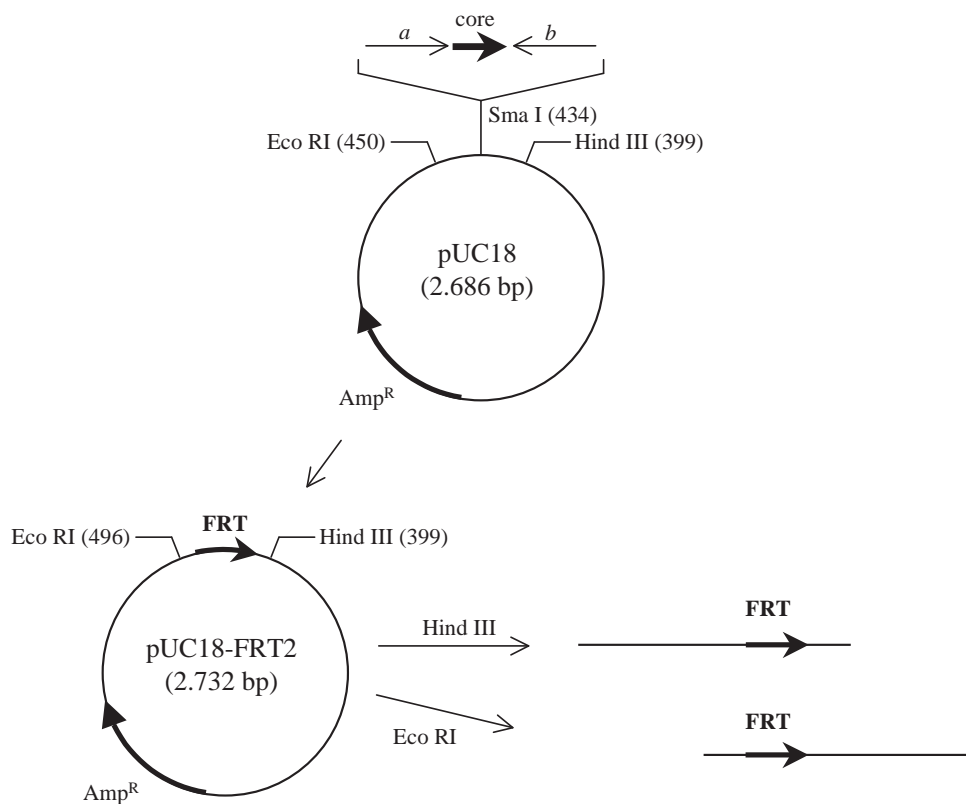


Abbildung 16: **Herstellung linearer Edukte**

Insertion der synthetischen FRT-site über SmaI in pUC18 ergab den Vektor pUC18FRT2, welcher alternativ mit EcoRI oder HindIII linearisiert wurde.

sche Auftrennung kann dann zumindest das Längere der beiden Produkte identifizieren. Zur Herstellung der Edukte (Abb. 16) wurden die beiden komplementären Oligonucleotide FLPSub2F und FLPSub2R phosphoryliert und hybridisiert. Dieses kurze DNA-Stück repräsentiert die FRT-site mit ihren Symmetrieelementen *a* und *b*, und konnte per blunt end Ligation in den mit SmaI linearisierten und mit alkalischer Phosphatase dephosphorylierten Vektor pUC18 insertiert werden. Das Konstrukt wurde sequenziert und erhielt den Namen pUC18-FRT2. Linearisierung von pUC18FRT2 mit EcoRI einerseits und HindIII andererseits lieferte die beiden Edukte mit gleicher Länge, aber verschiedener Orientierung der FRT-site. Getestet wurden mehrere Puffer und verschiedene Verhältnisse von FLP-Monomer zu FRT-half-site (Abb. 17).

Für die aussagekräftige Auswertung von Elektrophorese-Experimenten ist zu beachten, dass die Rekombinase nach Inkubation mit DNA noch kovalent am Substrat gebunden ist, und daher entfernt werden muss. Dies wurde hier mittels eines PCR-Aufreinigungs-Kits erreicht.

Für die Ausbeute ergibt sich folgende Berechnung: Für beide Edukte gilt, dass sie

6. PROJEKT A: FLP-REKOMBINASE

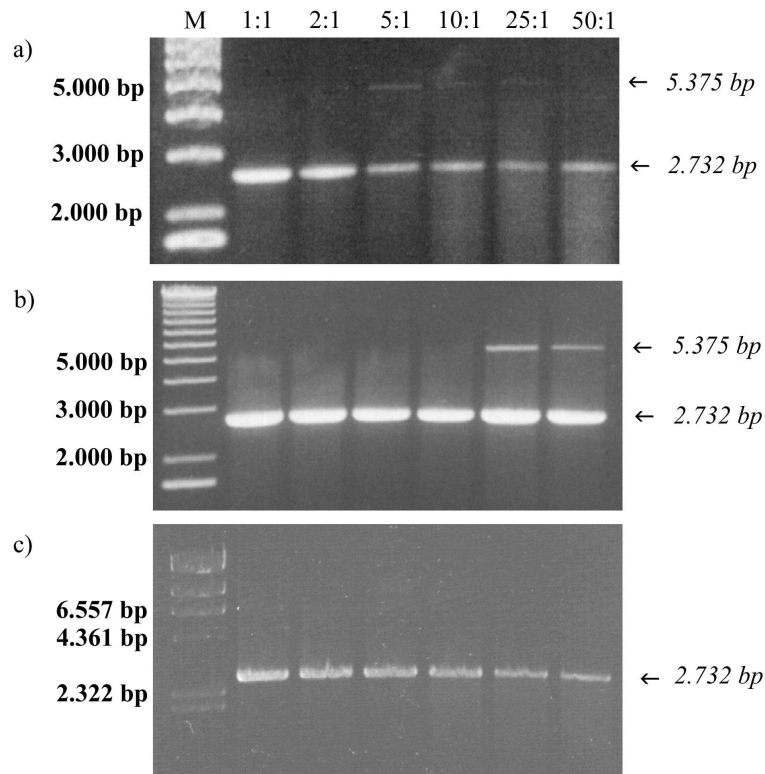


Abbildung 17: **Rekombination von 2.732 bp linearen Edukten**

Es wurden verschiedene Verhältnisse von FLP:FRT-half-site (entspricht FLP pro Bindungsstelle) getestet. **a:** Im hochviskosen FLP-Puffer 1 wird das 5.375 bp lange Rekombinationsprodukt schon bei Verhältnissen ab 5:1 gebildet. **b:** Im weniger viskosen FLP-Puffer 2 läuft die Rekombination ab einem FLP-Überschuss von 25-fach ab. **c:** Bei Verwendung des FLP-Puffers 3 (ohne Glycerin) konnte überhaupt kein Rekombinationsprodukt mehr detektiert werden. Edukt-Konzentration: jeweils 6,7 nM entspricht $c(\text{FRT-halfsites}) = 26,7 \text{ nM}$; FLP-Reihe von 26,7 nM bis 1,3 μM ; Vol. 15 μl ; Inkubation 3 h bei 30 °C; M (a und b): 1 Kb+ Marker; M (c): $\lambda/\text{HindIII}$ Marker

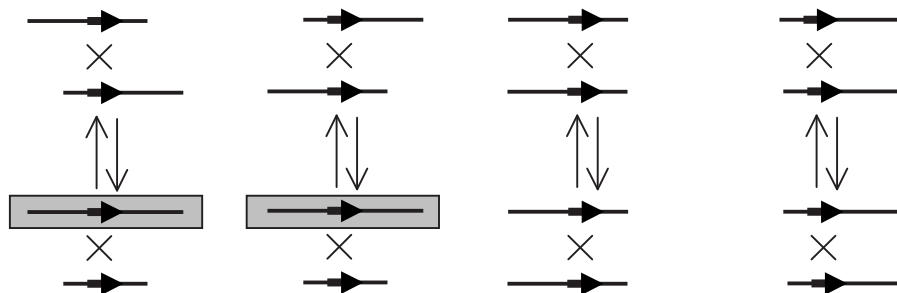


Abbildung 18: Die vier möglichen Reaktionen

Das 5.375 bp lange Reaktionsprodukt ist grau unterlegt.

jeweils mit sich selbst oder mit dem anderen Partner reagieren können (Abb. 18). Damit bestehen vier mögliche Rekombinationsreaktionen, wenn Neben- und Weiterreaktionen von Produkten hier vernachlässigt werden. Bei Annahme von jeweils in der Mitte liegenden Reaktionsgleichgewichten ergeben sich $\frac{2}{16}$ aller Teilchen als kurzes Reaktionsprodukt, $\frac{2}{16}$ als langes Reaktionsprodukt und $\frac{12}{16}$ als Edukte. Eingesetzt wurden insgesamt 13,7 nM Edukt im 15 μ l Ansatz. Für die Massen und damit für die auf dem Gel sichtbaren Banden errechnet sich folgendes:

	Anteil	bp	Stoffmenge	Masse
vorher	1	2.732 bp	200 fmol	362,4 ng
nachher	$\frac{1}{8}$	5.375 bp	25 fmol	89,1 ng
	$\frac{1}{8}$	89 bp	25 fmol	1,5 ng
	$\frac{3}{4}$	2.732 bp	150 fmol	271,8 ng

Die Bande des größeren, 5.375 bp Produkts ist mit ca. 89 ng in Abb. 17 gut durch Ethidiumbromidfärbung erkennbar. Damit belegt das Experiment, dass das Reaktionsgleichgewicht für alle angenommenen Reaktionen exakt in der Mitte liegt.

Die Prüfung auf Toleranz der FLP gegenüber Detergenzien ergab, dass Pluronic-F127 und PB/E-PEO die Rekombination in keiner Weise beeinflussen. Tests zur Temperaturabhängigkeit der Rekombination durch FLP zeigten, dass die Aktivität bei Raumtemperatur und 30 °C etwa so gut ist wie die bei 4 °C, während Temperaturen von 16 °C oder 10 °C sogar zu einer leichten Verbesserung der Reaktionsausbeute führen.

6.3 Messprinzipien zur Beobachtung von DNA-Rekombination mit Zweifarben-FCS

Für die Beobachtung von biochemischen Reaktionen in der Zweifarben-FCS ist zu berücksichtigen, dass das Messprinzip der Kreuzkorrelationsanalyse auf der Detektion von Änderungen im Anteil der zweifarbigen Spezies beruht. Daher müssen verschiedene Fluorophore zwischen *verschiedenen* Molekülen umorganisiert werden, was bei *intermolekularer* Reaktion der Fall ist. Alternativ müssen die Farbstoffe von *einem* auf *mehrere* Moleküle verteilt werden, was ideal für die Beobachtung von *intramolekularen* Reaktionen ist.

Da durch FLP katalysierte Rekombinationsreaktionen sowohl *inter-* als auch *intramolekular* möglich sind (Abb. 11, S. 61), können beide Reaktionstypen durch Zweifarben-FCS gemessen werden. Dabei kann je nach Position der Fluorophore auf- oder abbauende Kreuzkorrelationsamplituden erwartet werden. Für *intermolekulare* Rekombination bestehen drei prinzipielle Möglichkeiten der Positionierung von Farbstoffen (Tab. 9 bis 11). Bei den Berechnungen der zu erwartenden Kreuzkorrelationsamplituden wurde jeweils angenommen, dass sich die Reaktionsgleichgewichte in der Mitte befinden.

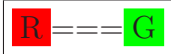
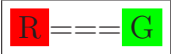
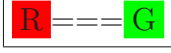
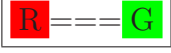
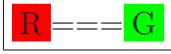
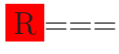



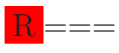


	Reaktion 1	Reaktion 2	Reaktion 3	Reaktion 4
Edukt 1:			====	====
	×	×	×	×
Edukt 2:		====		====
	⇕	⇕	⇕	⇕
Produkt 1:			==== 	====
	×	×	×	×
Produkt 2:		==== 		====

Tabelle 9: Abbauende Kreuzkorrelation durch intermolekulare Rekombination von unmarkierten mit zweifach markierten Substraten

Am Anfang der Reaktion gibt es nur Edukte, d.h. von 4 rot bzw. grün markierten Teilchen wären alle 4 auch doppelt markiert, was zu 100 % Kreuzkorrelation führen würde. Nach Ablauf aller gezeigten Reaktionen existieren von 8 rot bzw. grün gelabelten Molekülen genau 6 zweifarbig markierte. Daraus würde eine Kreuzkorrelation von 75 % resultieren. : roter Farbstoff; : grüner Farbstoff; ==== DNA; doppelt markierte Substrate sind eingerahmt

6. PROJEKT A: FLP-REKOMBINASE

	Reaktion 1	Reaktion 2	Reaktion 3	Reaktion 4
Edukt 1:	R ==== ×	R ==== ×	==== G ×	==== G ×
Edukt 2:	R ==== ⇕	==== G ⇕	R ==== ⇕	==== G ⇕
Produkt 1:	R ==== ×	R====G ×	==== ×	==== G ×
Produkt 2:	R ====	====	R====G	==== G

Tabelle 10: Aufbauende Kreuzkorrelation durch intermolekulare Rekombination von einfach markierten Substraten

Die Edukte zeigen eine Kreuzkorrelation von 0 %, während am Ende der Reaktion zwei von acht rot bzw. grün markierten Molekülen auch zweifarbig markiert sind, was einer maximal erreichbaren Kreuzkorrelation von 25 % entspricht.

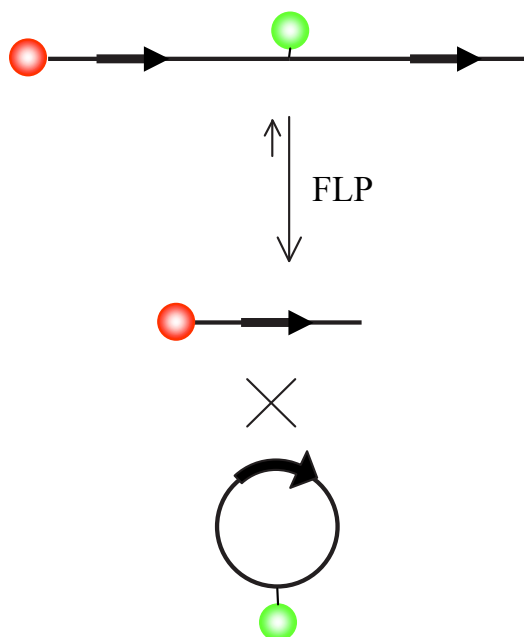


Abbildung 19: Abbauende Kreuzkorrelation durch intramolekulare Rekombination eines zweifarbig markierten Substrates

Ein Fluorophor muss endständig positioniert sein, während der andere Marker zwischen den beiden FRT-sites sitzen muss. Das Edukt bringt 100 % Kreuzkorrelation, während die Produkte 0 % Kreuzkorrelation zeigen. Die erreichbare Abnahme der Kreuzkorrelationsamplitude ist im Prinzip nur abhängig von der Lage des Gleichgewichtes.



































	Reaktion 1	Reaktion 2	Reaktion 3	Reaktion 4
Edukt 1:	 === 	 === 	 === 	 === 
	×	×	×	×
Edukt 2:	 === 	 === 	 === 	 === 
	⇕	⇕	⇕	⇕
Produkt 1:	 === 	 === 	 === 	 === 
	×	×	×	×
Produkt 2:	 === 	 === 	 === 	 === 

Tabelle 11: Aufbauende Kreuzkorrelation durch intermolekulare Rekombination von doppelt gleichfarbig markierten Substraten

Die Edukte zeigen 0 % Kreuzkorrelation. Von den zehn roten bzw. grünen Teilchen im Gleichgewicht sind vier Moleküle doppelt verschiedenfarbig markiert, was einem Anteil von 40 % entspricht. Für die Berechnung der maximal zu erwartenden Kreuzkorrelationsamplitude muss noch berücksichtigt werden, dass die Zahl der Teilchen, die mindestens einen roten (bzw. grünen) Farbstoff tragen, im Verlauf der Reaktion von acht auf zehn (Faktor $\frac{5}{4}$) ansteigt. Werden beispielsweise als Edukte 8 doppelt rot markierte und 8 doppelt grün markierte Substrate eingesetzt, so ergeben sich im hier dargestellten Gleichgewicht zehn Teilchen, die mindestens einen roten Farbstoff tragen, bzw. zehn Teilchen, die mindestens einen grünen Farbstoff tragen. Somit ist eine Abnahme der Autokorrelationsamplituden um den Faktor $\frac{8}{10}$ zu erwarten. Die zur Autokorrelationsamplitude ins Verhältnis gesetzte, relative Kreuzkorrelationsamplitude sollte dadurch um den Faktor $\frac{10}{8}$ höher als die oben ausgerechneten 40 % sein. Es sind also maximal 50 % relative Kreuzkorrelation im Gleichgewicht zu erwarten. : roter Farbstoff; : grüner Farbstoff; === DNA; doppelt markierte Substrate sind eingerahmt

Auch die Messung von intramolekularen *Excisionsreaktionen* ist leicht realisierbar, da im Edukt kombinierte Fluorophore im Produkt getrennt vorliegen. Eine reine Umlagerung von Farbstoffen innerhalb eines Moleküls wie bei intramolekularer *Inversionsreaktionen* würde nur dann ausreichen, wenn z.B. in einem weiteren Schritt eine endonukleolytische Spaltung vorgenommen würde. Gegenüber den *intermolekularen* Reaktionen hat die *intramolekulare* Excisionsreaktion auch den Vorteil, dass sie bei den niedrigen Konzentrationen in der FCS (nanomolarer Bereich) bevorzugt verläuft. Die Hinreaktion ist entropisch begünstigt, da aus einem Edukt zwei Produkte entstehen. Damit ist die Rückreaktion wiederum *intermolekular*, was insgesamt zu einer Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes auf die Produktseite führt. Das Prinzip der Beobachtung von *intramolekularen* Excisionsreaktionen durch abbauende Kreuzkorrelation ist in Abb. 19 gezeigt.

6. PROJEKT A: FLP-REKOMBINASE

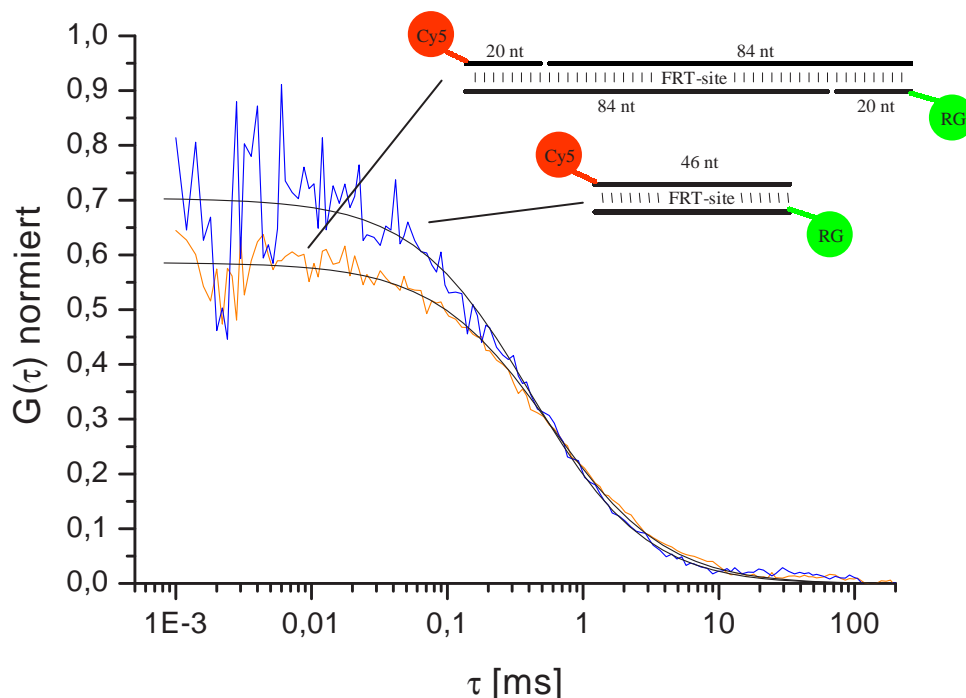


Abbildung 20: **Kreuzkorrelationsmessungen verschiedener durch Hybridisierung hergestellter intermolekularer FLP-Substrate**

Das Substrat des modularen Systems (104 bp) zeigt nur eine geringfügig niedrigere, aber noch völlig ausreichende Kreuzkorrelationsamplitude im Vergleich zum 46 bp Substrat. **orange:** normierte Kreuzkorrelationskurve des 104 bp Substrates; **blau:** normierte Kreuzkorrelationskurve des durch Hybridisierung der beiden Oligonukleotide FLPSub2F-RG und FLPSub2R-Cy5 präparierten 46 bp langen Substrates; **schwarz:** Fitanpassungen; Die Normierung der Kurven wurde wie in Abs. 4.4.1 beschrieben vorgenommen.

6.3.1 Generierung von Fluorophor-markierten Substraten

Die schnellste, einfachste und vor allem flexibelste Methode, Substrate für ein *intermolekulares* Assay zu generieren, besteht in der Hybridisierung komplementärer Oligonukleotide. Diese sind auch synthetisch gelabelt zu beziehen, was der Kombination von Farbstoffen quasi freien Lauf lässt, so dass alle in den Tab. 9 bis 11 dargestellten Assays zu abbauender und aufbauender Kreuzkorrelation durchführbar sind. Vor allem besteht bei Hybridisierung immer auch die Möglichkeit der flexiblen Sequenzwahl. Durch Verwendung von Oligonukleotiden mit einzelnen Mutationen lassen sich Substrate mit verschiedenen FRT-sites extrem schnell zu erzeugen. Um bei Verwendung der Standard-Fluorophore *Rhodamine green* und *Cy5* kostengünstig verschiedene FRT-sites zu erzeugen, wurde ein modulares System entwickelt, das es erlaubt, zwei ungelabelte Oligonukleotide mit zwei markierten Adaptoren zu annealen. Das so entstehende Substrat ist 104 bp lang (Abb. 20).

Alternativ können zwei komplementäre, am 5'-Ende markierte Oligonukleotide hybridisiert werden, die hier zu einem 46 bp langen Substrat führen.

Enthalten die Substrate mehr als eine FRT-site (z.B. für *intramolekulare* Anwendungen), oder sind längere Substrate gewünscht, so können diese durch PCR hergestellt werden. Der Einsatz von verschiedenen FRT-Sequenzen sowie unterschiedlichen Farbstoffkombinationen bleibt dabei flexibel, da sowohl die Fluorophore als auch die FLP-Erkennungssequenzen über die Primer eingeführt werden (Abb. 21).

6.3.2 Proteinase K Verdau

Anders als z.B. bei Spaltreaktionen, existiert in den Produkten einer Rekombinationsreaktion exakt die gleiche Bindungssequenz wie in den Edukten. Mitarbeiter aus Cox' Gruppe konnten für FLP in einem *challenging*-Experiment zeigen [35, 116], dass das Enzym, nachdem es einmal an sein Substrat gebunden ist, kaum wieder abdissoziiert. Auch etliche im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte FCS-Messungen belegen diese Beobachtung. Diese starke Substrat-Bindung hat auch Konsequenzen für das Zweifarben-FCS-Assay, welches ja in Lösung gemessen wird und ohne Anwendung von Separationstechniken wie Gelelektrophorese auskommen soll. Für eine Unterscheidung von Edukten und Produkten durch die Veränderung der Farbstoffkombinationen, wie für die hier beschriebenen Experimente, ist es unbedingt erforderlich, dass am Ende der Reaktion keine Komplexe mehr vorliegen, sondern nur noch die freie DNA. Dies lässt sich durch den proteolytischen Abbau der FLP-Rekombinase mit Proteinase K leicht erreichen. Aufgrund der FLP-Eigenschaft, kaum je vom Substrat wieder abzudissoziieren, können keine *on-line*-Kinetiken gemessen werden

6. PROJEKT A: FLP-REKOMBINASE

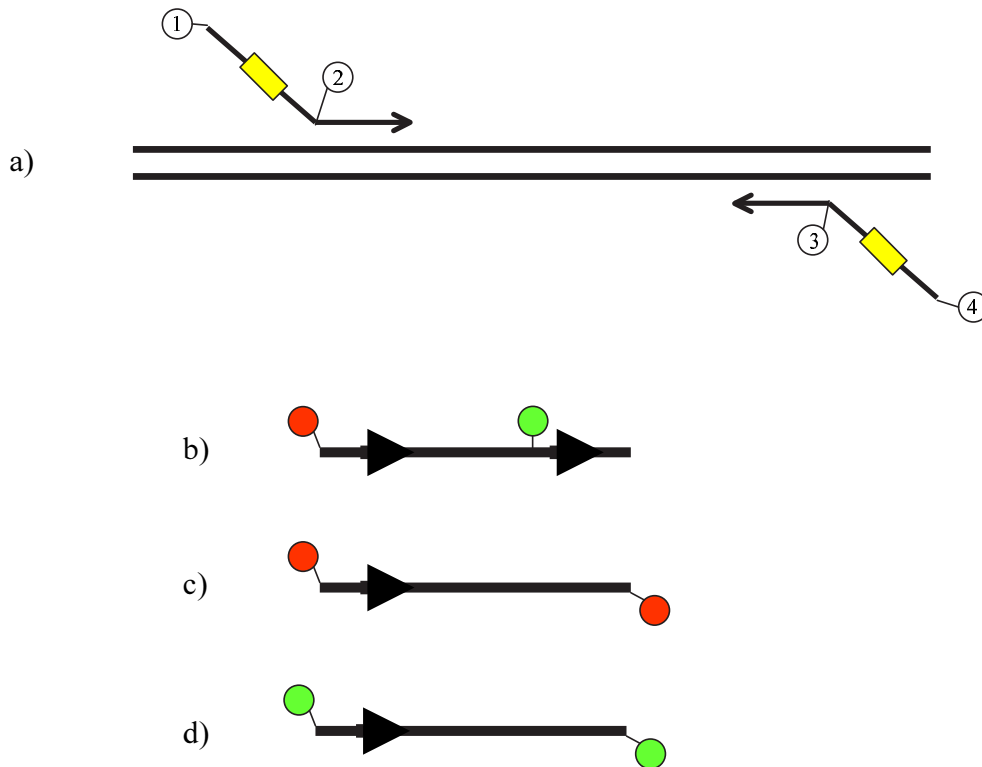


Abbildung 21: **Herstellung von FLP-Substraten durch PCR**

a: Prinzip der Einführung von Fluorophoren und FRT-sites über die Primer. Die FRT-sites (gelb dargestellt) können ein- oder zwei Mal eingeführt werden, und voneinander unabhängige Sequenzen und Orientierungen haben. Unterschiedliche Fluorophore können an einer oder mehrerer der mit 1-4 bezeichneten Stellen positioniert werden. **b-d:** Beispiele für FLP-Substrate, die im Rahmen dieser Arbeit durch PCR präpariert wurden. Schwarze Dreiecke symbolisieren FRT-sites. **b:** Zweifarbig markiertes 368 bp Substrat für intramolekulare Rekombination mit zwei FRT-sites gleicher Orientierung (vgl. Abb. 19), hergestellt durch die Primer Ev3FLP1-Cy5 und Ev3FLP2-int50-RG; **c:** Doppelt rot markiertes 343 bp-Substrat mit nur einer FRT-site für intermolekulare Rekombination (vgl. Tab. 11); Primer: Ev3FLP1-Cy5 und Ev3FLP3-Cy5; **d:** Ähnlich wie c), jedoch doppelt grün markiert durch die Primer Ev3FLP1-RG und Ev3FLP3-RG;

6.4 Messergebnisse zur FLP-Rekombination im ConfoCor2

6.4.1 Intramolekulare Rekombination von DNA lässt sich gut durch Kreuzkorrelationsanalyse beobachten

Für die Zweifarben-FCS Messungen von *intramolekularer* Rekombination wurde das 368 bp lange PCR-Produkt nach Abb. 21b, S. 74 als Edukt verwendet. Als Reaktionsprodukte werden ein *Cy5*-markiertes, kurzes lineares DNA Fragment von 54 bp Länge sowie ein 314 bp großes, zirkuläres Produkt mit internem *Rhodamine green* Label erwartet (Abb. 19, S. 70). Für FLP ist bekannt, dass inter- und intramolekulare Reaktionen durch unterschiedliche Puffer verschieden bevorzugt werden. Gleichwohl finden sich besonders zu den Effekten von ein- und zweiwertigen Ionen konträre Angaben in der Literatur [3, 42, 72, 90]. Insgesamt wurden vier verschiedene Pufferbedingungen (FLP-Puffer 4-7) für das intramolekulare Assay getestet.

In FLP-Puffer 6 und FLP-Puffer 7 konnte eine Abnahme der Edukt-Kreuzkorrelation mit steigender FLP-Konzentration gut beobachtet werden. Dieser Zusammenhang wurde über weite Bereiche als linear gefunden. Insgesamt war dabei in Puffer 7 (ohne BSA) eine etwa um $0,4 \mu\text{M}$ höhere FLP-Konzentration nötig, um ähnliche Ausbeuten wie in Puffer 6 (mit BSA) zu erhalten (Abb. 22).

Für die *intramolekulare* Reaktion ist unbedingt die Anwesenheit von zweiwertigen Ionen erforderlich (hier: 10 mM MgCl_2). FLP-Puffer 4 und FLP-Puffer 5 – jeweils ohne zweiwertige Ionen – ergaben keine *intramolekulare* Rekombinationsaktivität der FLP, die Kreuzkorrelationsamplituden blieben bei Verwendung dieser beiden Puffer konstant. Ohne zweiwertige Ionen konnte ein *intermolekularer* Umsatz (Abschnitt 6.2.3) sehr wohl detektiert werden. Insgesamt stehen diese Befunde in Einklang mit den Beobachtungen von Meyer-Leon [90] und Ringrose [72].

Neben der Kreuzkorrelationsanalyse kann als weiterer FCS-Parameter die Diffusionszeit τ_d der Moleküle betrachtet werden (Abb. 23). Nach dem Schema der Abbildung 19, S. 70 sollte für den rekombinierten Teil der rot (*Cy5*) markierten Spezies das Molekulargewicht von 368 bp (242,8 kDa) auf 54 bp (35,6 kDa) abnehmen was einem Faktor von etwa 6,8 entspricht. Für die Diffusionszeit, in die über die Formel (6) die Masse der Teilchen in der 3. Wurzel eingeht, bedeutet dies eine Abnahme etwa um den Faktor 1,9. Da am Ende der Reaktion eine Mischung von Edukten und Produkten vorliegt, wäre die ideale Auswertemethode hier eine Kurvenanpassung mit zwei Diffusionstermen (2-Komponenten-Fit). Wegen dem geringen Unterschied der Diffusionszeiten beider Komponenten ist in Näherung eine Auswertung durch 1-Komponentenanpassung ausreichend, welche die mittlere Diffusionszeit aller Komponenten liefert (Tab. 12).

Anders sehen die Verhältnisse im grünen Kanal (*Rhodamine green*) aus. Die Länge des grün markierten Substrates nimmt bei Rekombination von 368 bp (242,8 kDa) nur auf 314 bp (207,2 kDa) ab, was einem Faktor von 1,17 im Molekulargewicht und 1,05 für

6. PROJEKT A: FLP-REKOMBINASE

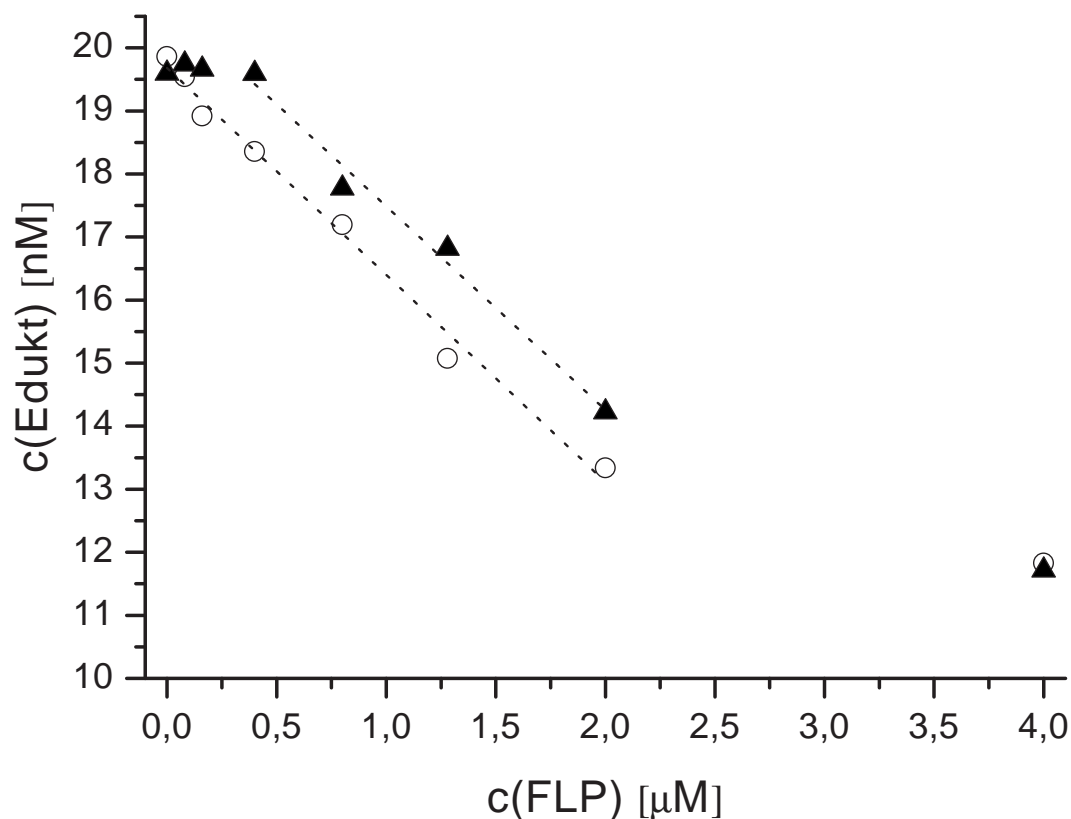


Abbildung 22: *Messung intramolekularer Rekombination durch Kreuzkorrelationsanalyse*

Das Prinzip dieser Messung ist in Abb. 19, S. 70 beschrieben. Es wurden Endpunktmessungen durchgeführt, wobei zu Beginn der Reaktion direkt nach Mischen der Komponenten und am Ende der Reaktion nach Proteinase K Verdau gemessen wurde. Aus dem Verhältnis der normierten Kreuzkorrelationsamplituden nachher/vorher wurden die Eduktkonzentrationen am Ende der Reaktion berechnet (Y-Achse). Dargestellt sind hier Messungen in **FLP-Puffer 6** (\circ) und **FLP-Puffer 7** (\blacktriangle). Reaktionsbedingungen: 20 nM PCR-Produkt (368 bp, Abb. 21b, S. 74) als Edukt; verschiedene FLP-Konzentrationen (X-Achse); Messungen: jeweils 20 x 10 sec; Inkubation 2 Std. bei RT; Proteinase K Verdau mit 1 U für 1 Std. bei RT; Vol.: 20 μ l in Nunc-8-well-Kammer;

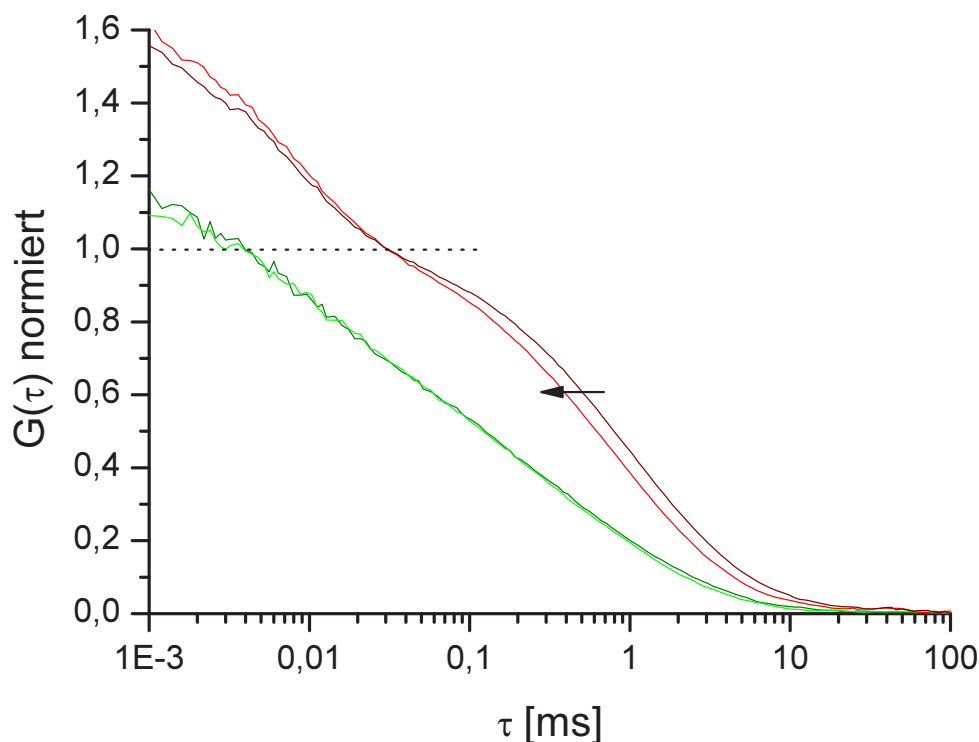


Abbildung 23: **Autokorrelationskurven zur Diffusionszeitanalyse**

Gezeigt sind die Autokorrelationskurven des roten und grünen Kanals, welche jeweils auf Teilchenzahl normiert wurden (gestrichelte Linie). **dunkelrot und dunkelgrün:** Edukte ohne FLP; **hellrot und hellgrün:** Produkte nach Inkubation mit 2 μM FLP und Proteinase K Verdau; Die Diffusionszeit der roten Teilchen nimmt ab (Pfeil). Reaktion in FLP-Puffer 6; Bedingungen und Messzeiten wie in Abb. 22 beschrieben.

τ_D entspricht. Diese geringe zu erwartende Abnahme der Diffusionszeit ist in der Praxis innerhalb der Fehlergrenzen der Kurvenanpassung kaum auflösbar.

Für die mittlere Diffusionszeit τ_D der roten Teilchen ergibt sich unter FLP-Einwirkung eine Reduktion um den Faktor 1,28 gegenüber der Kontrollreaktion ohne FLP (Tab. 12). Dies entspricht im wesentlichen dem erwarteten Wert, wenn die Tatsache mit einbezogen wird, dass es sich hierbei um eine mittlere Diffusionszeit einer Mischung aus Produkten und Edukten handelt. Dadurch ist also die Umlagerung bzw. Rekombinations des roten Fluorophors vom langen Edukt auf das kürzere der beiden Produkte bestätigt. Die Diffusionszeit der grünen Teilchen verringert sich kaum. Dies entspricht ebenfalls dem oben errechneten theoretischen Wert. Damit wird belegt, dass der grüne Marker nach erfolgreicher Rekombination am zirkulären Produkt sitzt, welches eine ähnliche Länge, Masse und Diffusionszeit hat, wie das Edukt.

6. PROJEKT A: FLP-REKOMBINASE

Kanal	Reaktion	τ_D [ms]	Fehler	Faktor
rot	vor	0,789	$\pm 0,014$	$1,28 \pm 0,05$
	nach	0,617	$\pm 0,013$	
grün	vor	0,598	$\pm 0,016$	$1,11 \pm 0,05$
	nach	0,536	$\pm 0,016$	

Tabelle 12: Fitwerte der Diffusionsanalyse des intramolekularen Rekombinationsassays

Der Faktor gibt den Unterschied zwischen den Werten vor und nach Reaktion mit FLP/Proteinase K an.

6.4.2 Intermolekulare Rekombination ist abhängig von der Länge der Substrate

FLP bindet an 46 und 104 bp lange Substrate Zur Beobachtung *intermolekularer* DNA-Rekombination durch FLP mittels Zweifarben-FCS wurden zunächst Experimente mit den kurzen, durch Hybridisierung hergestellten Substraten (46 bp) und mit den Substraten nach dem modularen System (104 bp) (20) durchgeführt. Für alle Strategien zur Verfolgung intermolekularer Rekombination durch auf- oder abbauenden Kreuzkorrelation (vgl. Tabellen 9 bis 11, S. 69ff) wurden übereinstimmende Messergebnisse erhalten. Diese belegen, dass FLP kurze Substrate von 46 oder 104 bp intermolekular bei Verhältnissen von FLP:FRT-half-site von 1:1 bis 50:1 *nicht* umsetzt. Bei keinem der vier getesteten Puffersysteme (FLP-Puffer 4-7) traten signifikante Veränderungen in der Kreuzkorrelation auf.

Zur weiteren Untersuchung dieses Phänomens wurde wurde geklärt, ob die hier verwendeten kurzen Substrate überhaupt von FLP gebunden werden. Für diesen Zweck ist der Parameter *Diffusionszeit* hervorragend geeignet. Der Nachweis von Bindung erfolgt anhand der τ_D -Zunahme, wobei unterschieden werden kann, ob FLP an das Substrat bindet, und ob es Holliday-Strukturen gibt. Die molekulare Masse des kurzen Substrates mit 46 bp Länge beträgt etwa 30,4 kDa, bei Bindung von zwei FLP (à 48 kDa) an die FRT-site steigt das Molekulargewicht auf 126,4 kDa, was einem Faktor von 4,2 entspricht. Aufgrund der Beziehung 6 erhöht sich die Diffusionszeit τ_D um den Faktor 1,6. Bei Existenz von Holliday-Strukturen sind zwei DNA-Substrate zu je 30,4 kDa und vier FLP-Monomere zu je 48 kDa zu einem Komplex zusammengelagert, haben also insgesamt ein Molekulargewicht von 252,8 kDa, was dem 8,3 fachen der molekularen Masse eines einzelnen Substrat-Moleküls entspricht. Dies schlägt sich in einer Erhöhung der Diffusionszeit um den Faktor 2 nieder.

Substrat	FLP	τ_D [ms]	Fehler	Faktor
FRT+	ohne	0,332	$\pm 0,006$	$1,28 \pm 0,04$
	1,21 μM	0,426	$\pm 0,007$	
FRT-	ohne	0,421	$\pm 0,009$	$1,13 \pm 0,06$
	1,21 μM	0,476	$\pm 0,014$	

Tabelle 13: Fitwerte der Diffusionszeitanalyse zur Bestimmung der Bindung von FLP an kurze intermolekulare Substrate

Angegeben sind die mittleren Diffusionszeiten der rot markierten Teilchen. Der Faktor gibt den Unterschied zwischen den Werten mit und ohne FLP an. FRT+: Substrat mit FRT-site (46 bp); FRT-: Substrat ohne FRT-site (66 bp); Messung in FLP-Puffer 4; Substratkonzentration: 13,3 nM, entspricht 26,6 nM FRT-halbsites

Die Analyse der Diffusionszeiten wurde mit zwei unterschiedlichen Substraten vorgenommen, die zum einen eine FRT-site enthielten, zum anderen ohne FRT-site waren. Die Fitanpassung der Autokorrelationskurven erfolgte mit dem Modell nach Gl. (3) und liefert zur Bestimmung der FLP-Bindung völlig ausreichende, mittlere Diffusionszeiten (Tab. 13) der zu erwartenden Spezies „ungebundenes Substrat“ und „gebundenes Substrat“.

Wie aus den Fitwerten der mittleren Diffusionszeiten (Tab. 13) zu entnehmen ist, bindet FLP an das Substrat mit FRT-site stärker als an das Kontrollsubstrat ohne FRT-site. Die gefundene Zunahme der Diffusionszeit um den Faktor $1,28 \pm 0,04$ für die Bindung von FLP an die DNA, aber nicht für die Ausbildung von Komplexen mit vier FLP und zwei Substraten (Holliday-Strukturen). Insgesamt ergeben die hier durchgeführten Messungen also, dass eine Bindung von FLP an kurze DNA-Substrate stattfindet, jedoch keine Bildung von Holliday-Strukturen und keine intermolekulare Rekombination erfolgt.

FLP bildet Holliday-Strukturen mit 343 bp langen Substraten Um den Einfluss der DNA-Länge auf die intermolekulare Rekombination weiter zu untersuchen, wurden 343 bp lange Substrate durch PCR hergestellt (Abb. 21c und d) und für Rekombinationsexperimente verwendet. Ähnlich wie bei den kurzen DNA-Substraten bereits registriert, belegen die Messergebnisse, dass mit diesen längeren Substraten keine intermolekulare Rekombination stattfindet. Für die Untersuchung der DNA-Bindung durch FLP konnte hier die Diffusionsanalyse nicht verwendet werden. Die mit FLP-Bindung

6. PROJEKT A: FLP-REKOMBINASE

verbundene Massenzunahme ist aufgrund der hohen Ausgangsmasse der Substrate nur sehr gering, so dass der Unterschied in der Diffusionsanalyse nicht aufgelöst werden kann. Da jedoch die Bindung von FLP an die kurzen Substrate bereits gezeigt werden konnte, wurde hier ebenfalls von einer Bindeaktivität ausgegangen und weiter untersucht, ob Holliday-Strukturen entstehen (Abb. 24). Dazu kann die Tatsache ausgenutzt werden, dass die beiden hier verwendeten Substrate verschiedene Farbstoffe tragen. Bei Entstehung von Holliday-Strukturen besteht eine Wahrscheinlichkeit von 0,5 für das Zusammenfinden von rot markierten mit grün gelabelten Substraten. Die Bildung solcher rot und grün markierten Holliday-Strukturen (Abb. 24a) sollte sich in einer Erhöhung der Kreuzkorrelationsamplitude zeigen. Nach Zugabe von Proteinase K werden die Rekombinase-Proteine hydrolysiert und die einfach markierten DNA-Moleküle wieder getrennt, wenn keine Rekombination stattgefunden hat. Wie in Abb. 24 gezeigt wird, bilden sich Holliday-Strukturen aus, wenn 343 bp langen Substrate als intermolekulare Edukte verwendet werden. Hierbei besteht eine lineare Abhängigkeit von der FLP-Konzentration, die eine Sättigung ab einem Überschuss von etwa 25 FLP pro FRT-half-site zeigt (Abb. 24b, Inset). Damit lässt sich für die nanomolaren Konzentrationen, mit denen hier gearbeitet wurde, feststellen, dass die Länge der DNA Substrate einen wichtigen Faktor für intermolekulare Rekombination durch FLP darstellt. Bindung erfolgt bereits bei sehr kurzen Substraten von 46 oder 104 bp, Holliday-Strukturen treten bei 343 bp langen Substraten auf.

Längere *intermolekulare* Substrate werden von FLP gut umgesetzt Da die *intermolekulare* Rekombination durch FLP mit längeren Substraten im nanomolaren Bereich funktioniert (Abschnitt 6.2.3), wurden weitere, längere Substrate für das Zweifarben-FCS-Assay gemäß Abb. 21, S. 74 generiert. Erste Versuche mit jeweils endständig positionierten Fluorophoren (Pos. 1 und 4 in Abb. 21a) zeigten eine Abhängigkeit der erreichbaren Ausgangs-Kreuzkorrelationsamplitude vom Abstand der Fluorophore. Je länger die Label voneinander entfernt an der DNA positioniert sind, desto geringer wird die Kreuzkorrelationsamplitude (Abb. 25).

Dieser Effekt hat Bedeutung für weiterführende Experimente zur Messung *intermolekularer* Rekombination mit Zweifarben-FCS. Für die Generierung längerer Substrate ist zu berücksichtigen, dass die Fluorophore beidseitig der FRT-site und nicht endständig positioniert werden (Pos. 1 und 2 in Abb. 21, S. 74). Das entwickelte System zur Erzeugung von Fluorophor-markierten PCR-Produkten ist ideal für diese Fragestellung und ließe bei Verwendung eines zweifach markierten Primers leicht die Herstellung (quasi beliebig) langer Substrate zu, in denen die Label nicht endständig sitzen.

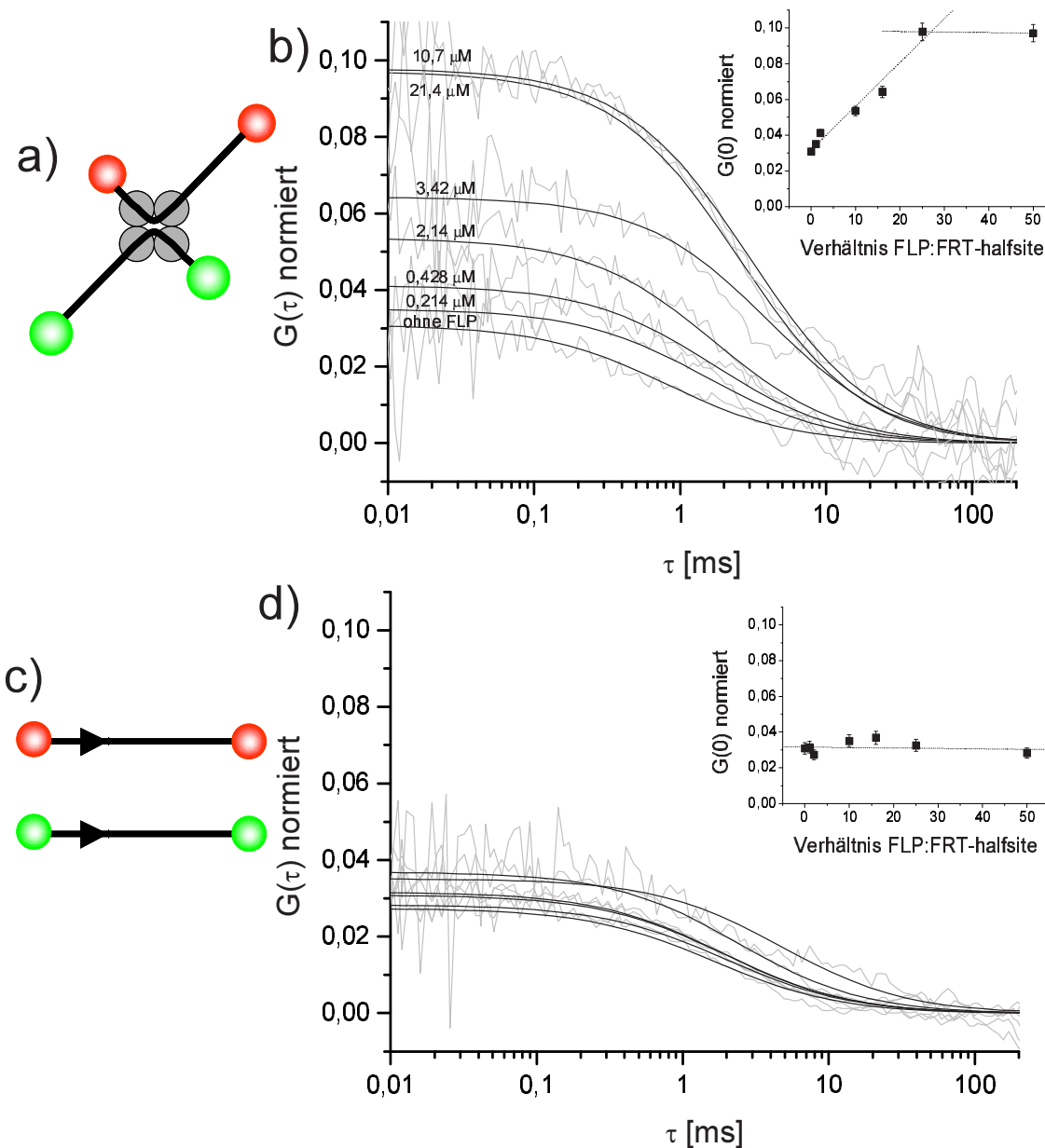


Abbildung 24: **Detektion von Holliday-Strukturen**

a: Holliday-Strukturen stellen hier kreuzkorrelierende Moleküle dar. grau: FLP-Monomer;
b: Kreuzkorrelationsmessungen (grau) und Fitanpassungen (schwarz) von doppelt rot und doppelt grün markierten 343 bp PCR-Produkten unter Anwesenheit von FLP in unterschiedlichen Konzentrationen. $c(\text{Edukt}) = 21,4 \text{ nM}$; Messung in FLP-Puffer 4; Vol.: 20 μl in 8-well-Nunc-Kammer; **Inset:** Auftragung der durch Kurvenanpassung ermittelten, normierten Kreuzkorrelationsamplituden $G(0)$ gegen das eingesetzte FLP:FRT-halfsite Verhältnis. **c: und d:** Grafik und Messkurven wie a) und b), jedoch nach Verdau mit 1 U Proteinase K für 1 Std. bei RT. Normierung der Kreuzkorrelationskurven wie in Abs. 4.4.1 beschrieben;

6. PROJEKT A: FLP-REKOMBINASE

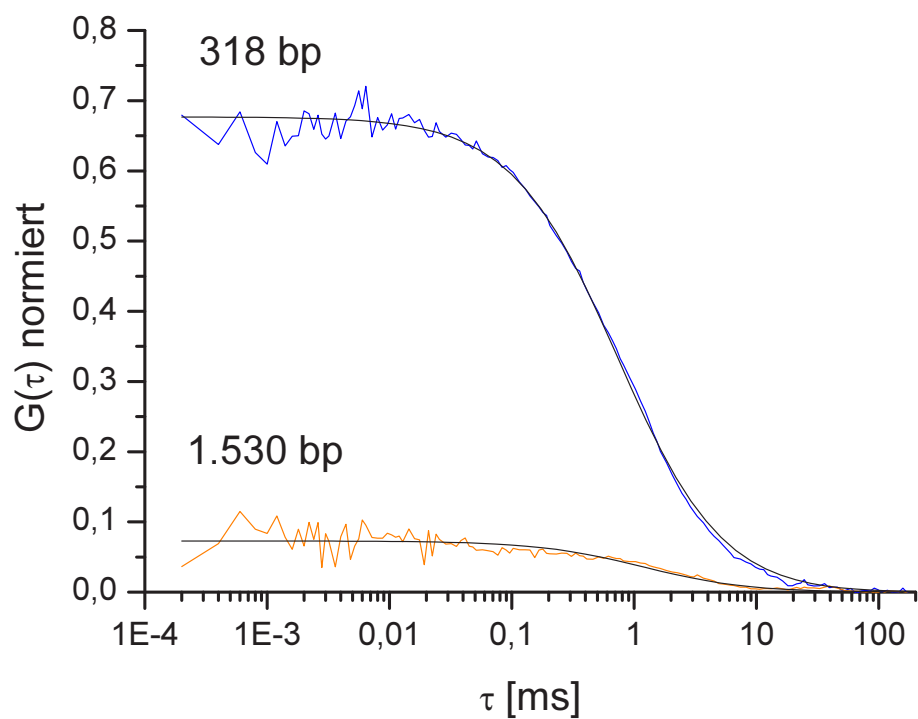


Abbildung 25: **Einfluss des Abstandes der Fluorophore auf die erreichbare Kreuzkorrelationsamplitude**

blau: Bei einem Abstand der Farbstoffe von 318 bp ergibt sich eine gute Kreuzkorrelationsamplitude. **orange** Sind die Marker 1.530 bp weit entfernt, sinkt $G(0)$ bereits erheblich. **schwarz:** Fitpassungen; Normierung der Kurven gemäß Abs. 4.4.1; Analyten: PCR-Produkte verschiedener Längen gemäß Abb. 21, S. 74 mit RG und Cy5;

6.5 Einsatz von FRET zur Beobachtung von Rekombination

Der als Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) bezeichnete strahlungslose Energieübergang zwischen Fluorophoren durch induzierte Dipol-Dipol-Wechselwirkung wurde erstmals 1948 von Förster beschrieben [32]. Das Energie abgebende Molekül wird als *Donor* bezeichnet, während der Partner dementsprechend *Akzeptor* heißt. Voraussetzung für den Transfer ist die Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors. Für die Transfereffizienz E besteht folgende Abstand-sabhängigkeit:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad (18)$$

Der *tatsächliche* Abstand R zwischen Donor und Akzeptor kann bei Kenntnis des *charakteristischen* Abstandes R_0 aus dem gemessenen Energieübertrag E ermittelt werden. Neben dem spektralen Überlapp und der räumlichen Orientierung der beiden Chromophore gehen auch der Brechungsindex des umgebenden Mediums sowie die Quantenausbeute des Donormoleküls in die Bestimmung von R_0 ein, was die Berechnung absoluter Entfernungen erschwert. In der Praxis wird R_0 für ein gegebenes FRET-Paar daher häufig als (bekannte) Konstante betrachtet und bezeichnet konkret denjenigen Abstand, an dem die Transfereffizienz 50 % beträgt (Abb. 27a).

Abhängig vom gewählten Farbstoffpaar lassen sich Abstände zwischen 1 bis 7,5 nm mit Hilfe dieses Effektes messen. Diese wichtige Möglichkeit, auch unter physiologischen Bedingungen solch geringe Abstände messen zu können, eröffnet der FRET-Methode eine Vielzahl verschiedener Anwendungen [100].

6.5.1 Prinzip des Systems

In diesem Abschnitt wird eine Strategie vorgestellt, FRET zur Messung von DNA-Rekombinationsereignissen einzusetzen. Verwendet wurde hier das Donor-Akzeptor-Paar TAM RA und *Cy5*, welches einen charakteristischen Abstand R_0 von 5,3 nm aufweist [23]. Das Substrat für die intramolekulare Rekombination wurde durch PCR hergestellt. Die Positionen der Fluorophore wurden so gewählt, dass sie sich jeweils innerhalb der core-Region der FRT-sites befinden (Abb. 26), welche nicht von FLP bedeckt wird. Der Vorteil dieser Positionierung ist, dass bei Rekombination oder Bildung von Holliday-Strukturen eine sehr große Änderung des Abstandes zwischen Donor und Akzeptor erfolgt. Im Edukt existiert ein Abstand von ca. 100 nm (316 bp) zwischen den Fluorophoren, während diese sich in der Holliday-Struktur auf einige wenige nm annähern. Im Produkt wären die Label an direkt benachbarte Nukleotide des komplementären Stranges gebunden. Getestet wurde, inwieweit die Farbstoffe durch ihre räumliche Ausdehnung sterisch die Bindung von FLP und damit die Ausbildung von Holliday-Strukturen beeinflussen, und ob die Bildung des hypothetischen Produktes stattfindet.

6. PROJEKT A: FLP-REKOMBINASE

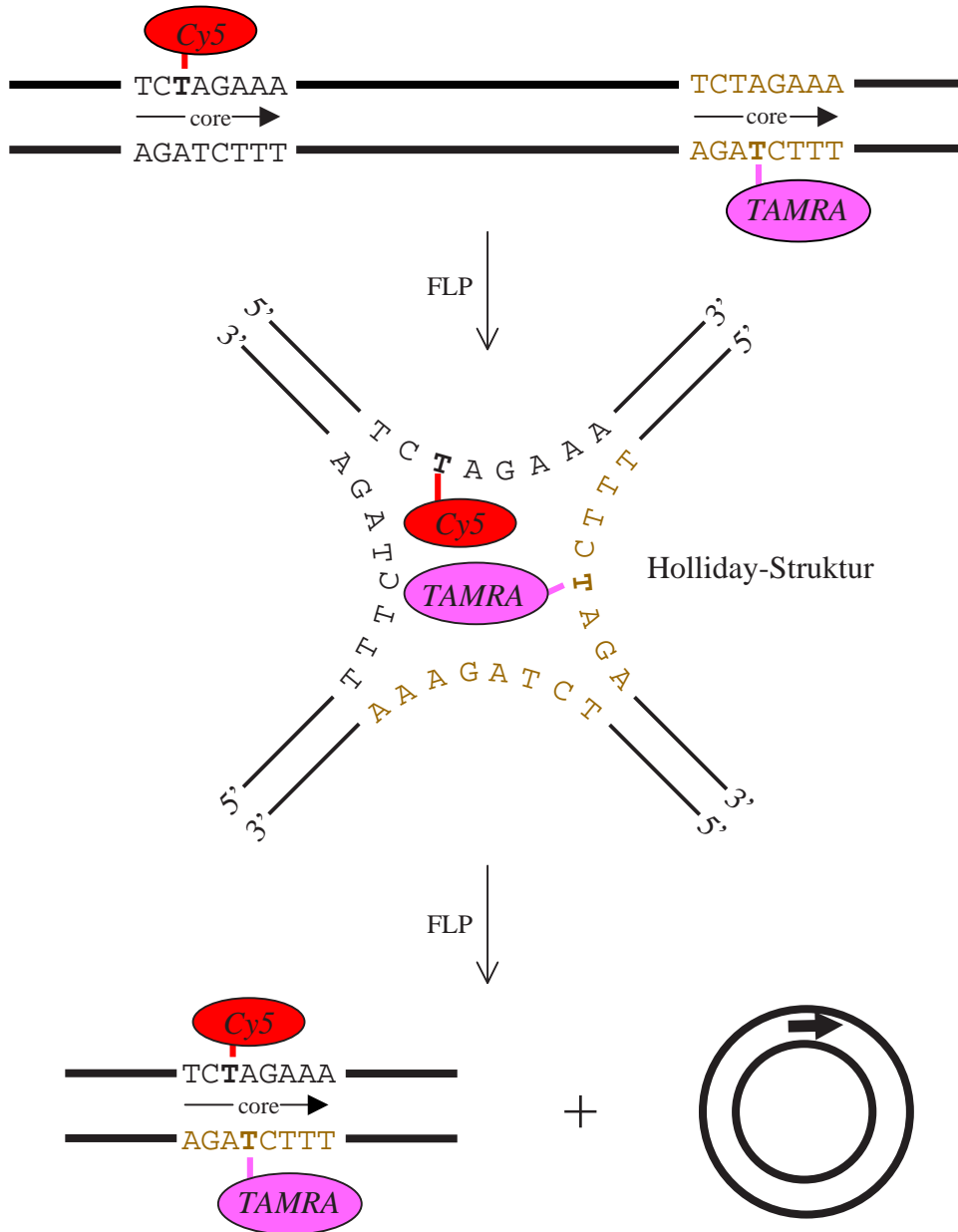


Abbildung 26: **Das Konzept der Beobachtung von Rekombination durch FRET**
oben: Das 368 bp PCR-Fragment wurde mit den Primern Ev3FLP1-int26-Cy5 und Ev3FLP2-int28-TAMRA hergestellt. **mitte:** In der Holliday-Struktur kommen sich die Fluorophore sehr nahe. **unten:** Das kürzere der beiden Produkte trägt beide Fluorophore an benachbarten Basen. Die Abbildungen sind nicht maßstabsgetreu.

6.5.2 Messergebnisse zur Beobachtung von DNA-Rekombination mit FRET

Die Effizienz E des Energietransfers wurde im ConfoCor2 gemessen, wobei zur Bestimmung der Helligkeiten η von Donor (D) und Akzeptor (A) der Parameter Zählrate pro Molekül (counts per molecule, cpm) herangezogen wurde. Die Berechnung erfolgte jeweils durch Division der mittleren Zählrate durch die Anzahl N der Moleküle im Fokus, entnommen aus den Kurvenanpassungen der Autokorrelationen. Kontrollmessungen wurden durchgeführt, um Fehler durch Übersprechen des grünen Kanals in den roten Kanal (*cross-talk*) sowie Rest-Anregung des roten Farbstoffes durch den grünen Laser (*cross-excitation*) ausschließen zu können. Dazu wurden PCR-Substrate verwendet, die entweder nur mit TAMRA oder nur mit *Cy5* markiert waren. Die für diese beiden Substrate gemessenen η im roten Kanal wurden von allen anderen Messungen subtrahiert. Die Abschätzung des Energietransfers E wurde nach folgender Formel [22] vorgenommen:

$$E = \frac{\eta_A}{\eta_A + \eta_D} \quad (19)$$

Die für E gemessenen Werte sind in Abb. 27b dargestellt. Mit steigender FLP-Menge ist eine Zunahme des Energietransfers zu beobachten, was darauf hinweist, dass die beiden Fluorophore durch FLP in räumliche Nähe gebracht werden. Das in Abb. 26 gezeigte hypothetische Reaktionsprodukt entsteht jedoch nicht. Nach Entfernen der FLP-Rekombinase durch Proteinase K Verdau konnte wieder der gleiche Energietransfer beobachtet werden, den das Edukt alleine bringt (Daten nicht gezeigt). Das hier verwendete Substrat ist in Sequenz und Länge identisch mit dem bisher erfolgreich eingesetzten intramolekularen Substrat. Statt *Rhodamine green* wurde hier TAMRA benutzt, was aber für den Erfolg der Rekombination nicht kritisch sein sollte. Vielmehr ist anzunehmen, dass die Anwesenheit der Fluorophore in der core-Region sterische Auswirkungen auf die Weiterreaktion der Holliday-Struktur hat, und damit die eigentliche Rekombination blockiert wird. Die Entstehung von Holliday-Strukturen und damit die Beobachtung der Komplexbildung wird dadurch jedoch nicht berührt.

Zur Abschätzung des Anteils an gebildeten Holliday-Strukturen aus den gemessenen Transfereffizienzen E wurde die Annahme gemacht, dass es in diesem System genau zwei Zustände mit unterschiedlichen Abständen R der Fluorophore gibt: zum einen die Holliday-Struktur (bzw. den Komplex) mit R_1 , zum anderen das Edukt mit R_2 . Für R_1 wurde hier ein Wert von etwa $1,5 \pm 1$ nm angenommen. In Anbetracht der bekannten kristallographischen Daten der Holliday-Struktur [18] sowie der „linker-Länge“ (Abb. 9) stellt dieser Wert eine plausible Abschätzung dar, selbst unter Berücksichtigung einer teilweisen Beweglichkeit der beiden Chromophore. Der durch diese Annahme entstehende Fehler ist sehr gering, denn im unteren Bereich von R (0-2,5 nm) ist E fast konstant (Abb. 27a), und erst oberhalb von 3 nm wird die Abweichung von 1 größer als 5 %. Für das Edukt ergibt sich – bei Annahme absoluter Steifigkeit des Moleküls – formal mit

6. PROJEKT A: FLP-REKOMBINASE

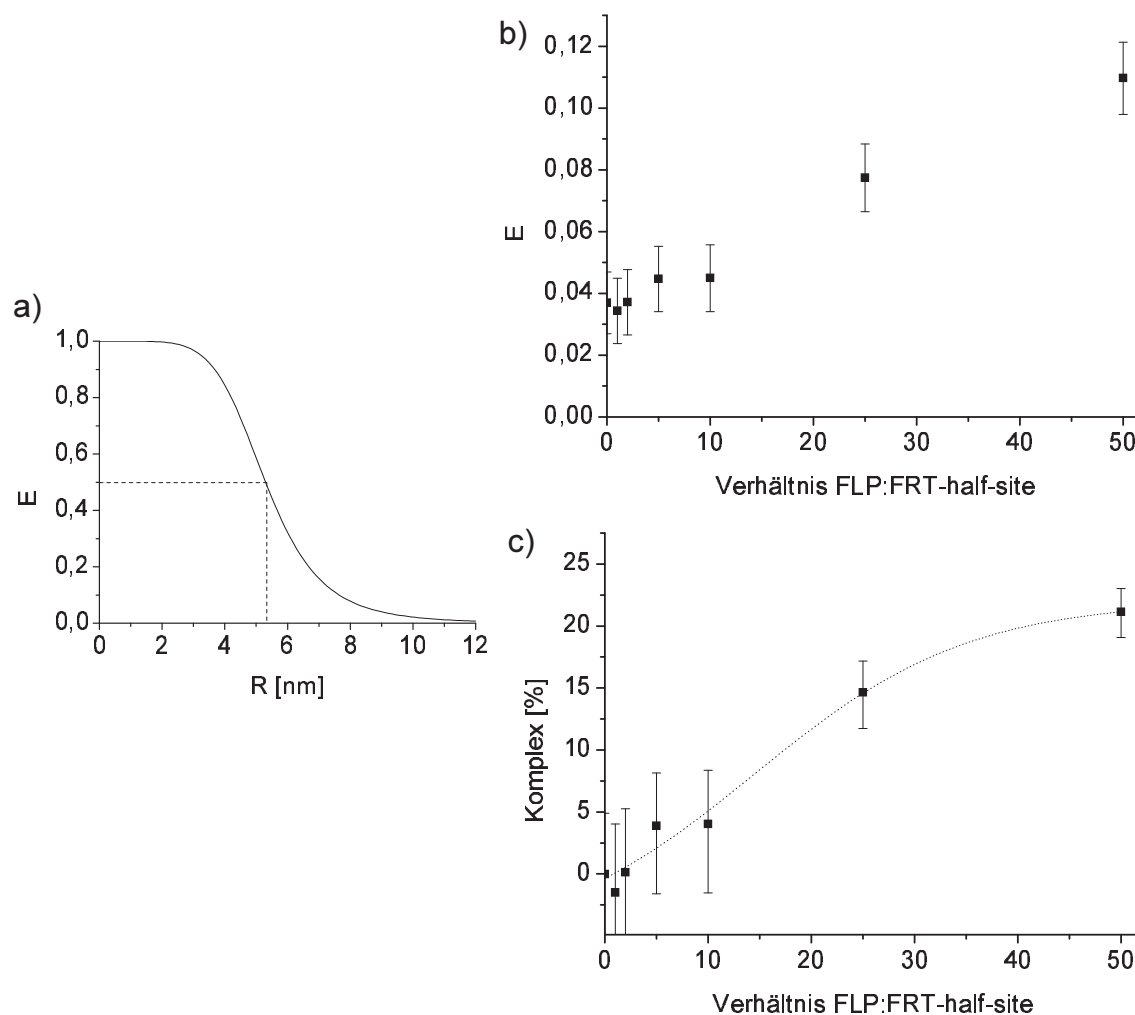


Abbildung 27: Energietransfer und Anteil von Holliday-Strukturen in Abhängigkeit der FLP-Konzentration

a) nach Gl. (18) berechnete Energie-Effizienz in Abhängigkeit des Abstandes; $R_0 = 5,3$ nm (gestrichelt); **b)** gemessene Transfereffizienz in Abhängigkeit der FLP-Konzentration; **c)** Anteil an Holliday-Strukturen in Abhängigkeit der FLP-Konzentration, berechnet nach Gl. (20); Inkubation des 368 bp PCR-Fragmentes (Abb. 26) in FLP-Puffer 6 und verschiedenen FLP-Konzentrationen, ohne Proteinase K Verdau; Substratkonzentration: 36 nM, entspricht 144 nM FRT-half-sites; Messung im ConfoCor2; Anregung: 514 nm Linie des Argon-Ionen-Lasers, 25 % Röhrenstrom, 10 % AOTF; Strahlengang: HFT 514, NFT 635, Emissionsfilter: Kanal 1 (rot): LP650, Kanal 2 (grün) BP530-600; Pinhole-Ø: 90 μm ;

6. PROJEKT A: FLP-REKOMBINASE

3,4 nm Ganghöhe pro DNA-Windung (10,5 bp) und bei einem Fluorophor-Abstand von 316 bp ein Wert von etwa 100 nm. In der Praxis erhält man jedoch bereits für das Edukt eine Transfereffizienz von $E = 0,037$. Dieser Hintergrund ist durch die Flexibilität der DNA begründet und liefert bei Einsetzen in Gl. (18) einen apparenten Abstand R_2 von 9,2 nm.

Für das System kann aus dem gemessenen Energieübertrag E ein mittlerer Abstand \bar{R} berechnet werden, der sich aus R_1 und R_2 anteilig zusammensetzt:

$$\sqrt[6]{\frac{R_0^6 - ER_0^6}{E}} = \bar{R} = nR_1 + (1 - n)R_2 \quad (20)$$

In dieser Gleichung gibt n den Anteil der Spezies mit R_1 , also der Holliday-Strukturen an. Setzt man die für R_1 und R_2 angenommenen Werte von 1,5 nm und 9,2 nm ein, ergibt sich die in Abb. 27c dargestellte Abhängigkeit der Komplexbildung (Komplex [%]) von der FLP-Konzentration (Verhältnis FLP:FRT-half-site). Der maximal erreichbare Anteil an Holliday-Strukturen nähert sich etwa 20-25 %. Eine Sättigung, wie sie bei der Zweifarben-FCS-Experimenten beobachtet wurde, ist bei diesem Substrat bis zu einem Verhältnis von 50 FLP-Monomeren pro FRT-half-site nicht zu erkennen.

6.6 Entwicklung eines *in vitro* Selektionssystems für FLP

Die in diesem Abschnitt vorgestellte System zur Veränderung der Substratspezifität der FLP-Rekombinase beinhaltet eine Selektions-Strategie, die nicht auf Screening basiert – wofür die weiter oben beschriebenen Assays konzipiert wurden – sondern beruht auf einer Kombination aus Kompartimentierung, *in vitro* Expression und Selektion durch Genotyp-Phänotyp-Kopplung.

6.6.1 Prinzip des Systems

Das Prinzip des Gesamtsystems ist in Abb. 28 dargestellt. Die einzelnen Schritte laufen wie folgt ab:

- Die **Variation** des FLP-Gens erfolgt durch Zufallmutagenese mit Fehler erzeugender PCR („error-prone PCR“). Die Fehlerrate kann über PCR-Bedingungen eingestellt werden [17, 68]. Damit entsteht eine Bibliothek von unterschiedlichen Genotyp-Varianten der FLP-Rekombinase.
- Als besondere Form der *in vitro* **Kompartimentierung** wird eine Wasser-in-Öl-Emulsion benutzt (Abschnitt 6.6.2). Die FLP-Varianten werden dabei auf die wässrigen Reaktionsräume verteilt, so dass statistisch pro Kompartiment genau ein Genotyp vorliegt.
- **Expression** der einzelnen Genotypen in den Tröpfchen wird durch gekoppelte *in vitro* Transkription/Translation realisiert (Abschnitt 6.6.3). PCR-Produkte, wie sie aus der Variation stammen, stellen dabei ideale Templates dar.
- Die **Selektion** von positiven FLP-Varianten erfolgt durch Genotyp-Phänotyp-Kopplung (Abb. 29). Es werden nur diejenigen FLP-Genotypen als „positiv“ markiert, deren zugehöriger Phänotyp (im gleichen Kompartiment) die vorgelegte FRT-site rekombinieren konnte.
- Die **Amplifikation** der als positiv markierten Varianten geschieht durch PCR (Abb. 29b) nach Extraktion der Gesamt-DNA aus der Emulsion.

Das Konzept der Genotyp-Phänotyp-Kopplung Die Strategie zur Unterscheidung aktiver von inaktiven FLP-Varianten basiert auf dem Prinzip der Genotyp-Phänotyp-Kopplung (vgl. Abb. 29). Als Genotyp dient hier ein lineares, durch (error-prone) PCR hergestelltes DNA-Fragment, welches das FLP-Gen mit T7-Promotor trägt. Beidseitig wird das Gen durch FRT-sites flankiert, welche gleiche Orientierung haben und flexibel durch die PCR-Primer einbringbar sind. Die Primer beinhalten zusätzlich jeweils am 5'-Ende drei Phosphorothioate, die Schutz gegen Exonukleasen bieten [60, 111] und so die

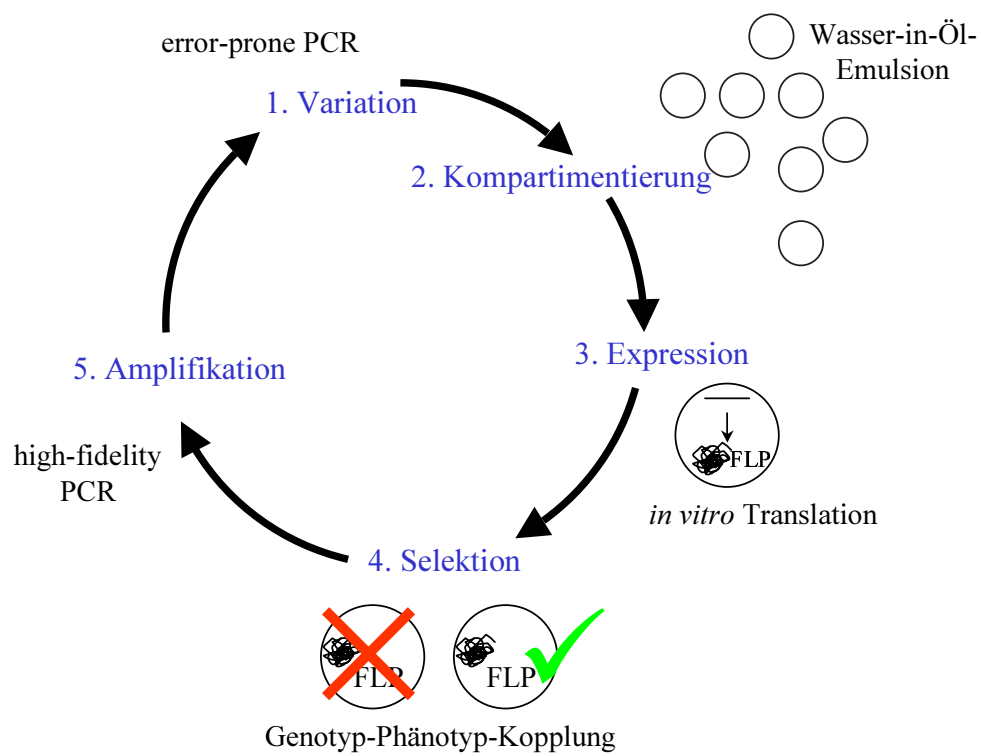


Abbildung 28: *Prinzip der evolutiven Strategie zur Veränderung der Substratspezifität von FLP*

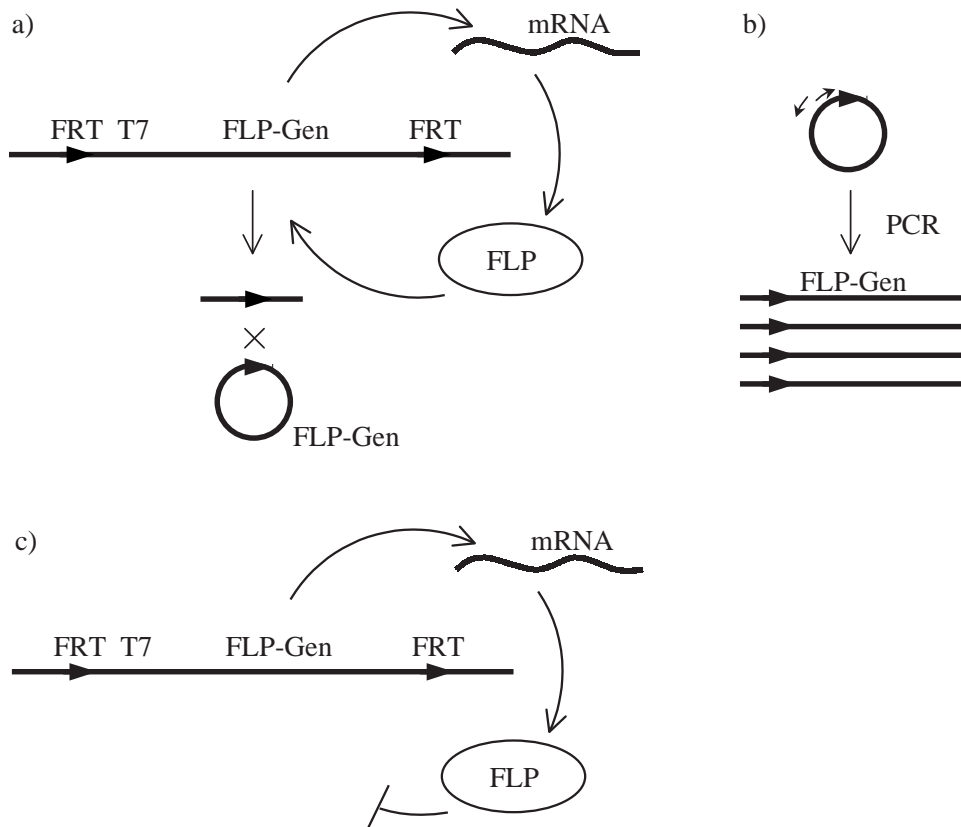


Abbildung 29: **Selektion positiver FLP-Varianten durch Genotyp- Phänotyp-Kopplung**

a: positiver Fall: das FLP-Gen (Genotyp) wird exprimiert und das FLP-Protein (Phänotyp) kann die flankierenden FRT-sites umsetzen, was zur Zirkularisierung führt. **b:** Durch PCR können selektiv zirkularisierte FLP-Gene amplifiziert werden. **c:** negativer Fall: ein inaktiver Phänotyp kann die FRT-sites nicht umsetzen, und die PCR ergibt kein Produkt.

Stabilität des PCR-Produktes im S-30-Extrakt erhöhen. Durch *in vitro*-Expression des Genotyps wird FLP-Protein synthetisiert, welches den Phänotyp repräsentiert. Die Rückkopplung auf den Genotyp erfolgt, wenn die gebildete FLP-Rekombinase die FRT-sites als Substrat erkennen und umsetzen kann. Dabei wird der Genotyp zirkularisiert und somit als positiv markiert. Inaktive FLP-Mutanten oder Varianten die die vorgegebenen FRT-sites nicht als Substrat umsetzen können, führen nicht zu einer Zirkularisierung.

Die Detektion von zirkularisierten Genotypen, die für aktive Phänotypen codieren, erfolgt durch PCR. Die Primer werden so gesetzt, dass die Amplifikation über den Ringschluss hinweg verläuft, so dass lineare Templates (auf die die Primer auch binden) nicht amplifiziert werden können. Das erhaltene PCR-Produkt trägt so nur die Gene aktiver FLP-Varianten.

6.6.2 Wasser-in-Öl-Emulsionen als künstliche Biocontainer

Für die erfolgreiche Anwendung von Wasser-in-Öl-Emulsionen als Kompartimentierungsmethode für die evolutiven Biotechnologie sind folgende Punkte entscheidend:

- Innerhalb der Tröpfchen muss sich *in vitro*-Translation bewerkstelligen lassen.
- Sowohl die hydrophobe Phase (Öl) als auch die Detergenzien dürfen biochemische Reaktionen in der wässrigen Phase nicht inhibieren.
- Der Emulgierprozess sollte einerseits schnell genug sein, andererseits so schonend, dass eingebrachte Biomoleküle nicht beschädigt werden.
- Da sich statistisch in jedem Kompartiment nur ein DNA-Template befinden soll, müssen sich die Volumina der Kompartimente in einem engen Rahmen bewegen, d.h. die Größenverteilung darf nicht zu breit sein.
- Eingesetzte DNA muss aus der wässrigen Phase intakt zurückgewonnen werden können.

Welche Tröpfchengröße ist ideal und wie kann sie gemessen werden? Zu kleineren Durchmessern hin ergibt sich als untere Grenze schlicht der Raumbedarf der Reaktanden (Ribosomen: 30-40 nm), so dass Tröpfchen kleiner als einige hundert nm im Durchmesser hier biochemisch keinen Sinn mehr machen. Für die Abschätzung des oberen Bereiches der optimalen Tropfengröße muss berücksichtigt werden, dass sich genau *ein* DNA-Template pro Kompartiment befindet. Bei Annahme eines Tropfendurchmessers von $2\text{ }\mu\text{m}$ errechnet sich ein Volumen zu $4,19 \cdot 10^{-18}\text{m}^3$ oder 4,19 fl. Bei einem DNA-Template ($1,66 \cdot 10^{-24}$ Mol) in diesem Volumen ergibt sich eine DNA-Konzentration von ca. 0,4 nM – eine Konzentration, wie sie für gekoppelte *in vitro*-Transskription/Translation noch ausreichend ist. Mit steigendem Tropfendurchmesser steigt das Volumen und sinkt die Konzentration in der dritten Potenz. Bereits für einen Durchmesser von $10\text{ }\mu\text{m}$ ergäbe sich ein 125-fach größeres Volumen, und damit eine um den Faktor 125 geringere DNA-Konzentration, was schnell zum Erliegen der Transkriptions- und Translationseffizienz führt. Demnach ist die optimale Größe der Kompartimente nach oben hin sicherlich im Bereich bis $10\text{ }\mu\text{m}$ angesiedelt.

Zur Bestimmung der Größenverteilung sehr kleiner Emulsionen (unter $1\text{ }\mu\text{m}$) kann dynamische Lichtstreuung eingesetzt werden. Für größere Tröpfchen (ab $1\text{ }\mu\text{m}$) kann der für die Messung einzustellende Kompromiss zwischen dem Abstand der Teilchen ($> 20\text{ }\mu\text{m}$) einerseits und der Anzahl der Teilchen (> 190) im Messvolumen der Streuapparatur andererseits kaum noch erreicht werden. Alternativ kann dann auf bildgebende Verfahren z.B. durch Laser-Scanning-Mikroskopie mit anschließender Partikelerkennung und Auszählung

6. PROJEKT A: FLP-REKOMBINASE

	System 1	System 2
Öl-Phase; Viskosität	Mineral-Öl; 26 cP (light white mineral oil)	Isopar M; 1,915 cP (ein Isoparaffin)
Detergenz	Span 80 (4,5% v/v) Tween 80 (0,5% v/v)	P/BE-PEO ² (1% w/w)
Emulgation	Ultra-Turrax	Ultraschall
Größenbestimmung	Imaging	dynamische Lichtstreuung
Tröpfchen-Größe	2 μm	0,24 μm

Tabelle 14: Daten der beiden Emulsions-Systeme

Zum Vergleich: Viskosität von $H_2O = 0,8904$ cP; Alle Viskositäten gelten für 25°C , Angaben in centiPoise; Die Angabe der Tröpfchen-Größe bezeichnet den Durchmesser der Tröpfchen mit dem größten Volumenprozentanteil.

durch Software ausgewichen werden.

Besonders im Hinblick auf eine Anwendung von Emulsionen als künstliche Biocontainer in Evolutionsexperimenten macht die Volumenprozent-Auswertung Sinn. Dieser Wert gibt an, welcher Anteil vom gesamten wässrigen Volumen in Tröpfchen eines diskreten Durchmesserbereiches enthalten ist. Einzelne unerwünscht große Tropfen machen sich dabei schnell bemerkbar, da sie leicht über 90 % des Gesamtvolumens beinhalten könnten. Die Anwesenheit solcher Tropfen muss für Systeme zur Evolution unbedingt ausgeschlossen werden, da innerhalb dieser großen Kompartimente eine Vermischung verschiedener Varianten stattfinden würde.

Herstellung von Wasser-in-Öl-Emulsionen und Bestimmung der Größenverteilung Zur Herstellung von Emulsionen der beschriebenen Größenordnung wurden die folgenden vier, leicht im Labor zugänglichen Methoden eingesetzt: Mischen durch Vortexen, Rühren mit Magnetkernen, Ultraschall und Homogenisation mit dem Ultra-Turrax. Letzteres Gerät ist ein Hochgeschwindigkeitsmischer nach dem Rotot-Stator-Prinzip. Als Öl/Detergenz-Kombinationen wurden zwei verschiedene Systeme untersucht (Tabelle 14).

Eine erste visuelle Abschätzung der Größenverteilung erfolgte lichtmikroskopisch. Dabei stellte sich heraus, dass Emulsionen, die durch Mischen im Vortexer oder durch Rühren mit Magnetkernen hergestellt wurden, noch viele sehr große Tropfen enthielten (Abb. 30), weswegen diese beiden Herstellungsmethoden als ungeeignet erscheinen. Homogenisation mit dem Ultra-Turrax lieferte für das viskose Mineralöl-System sehr gute Ergebnisse (Abb. 31 und 32). Das wesentlich dünnflüssigere Isoparaffin ließ sich weniger gut durch

²Poly-butylen/ethylen-Polyethylenoxyd-Block-Copolymer, Geschenk von Dr. K. Landfester, MPI für Kolloid- und Grenzflächenforschung, Golm, Potsdam

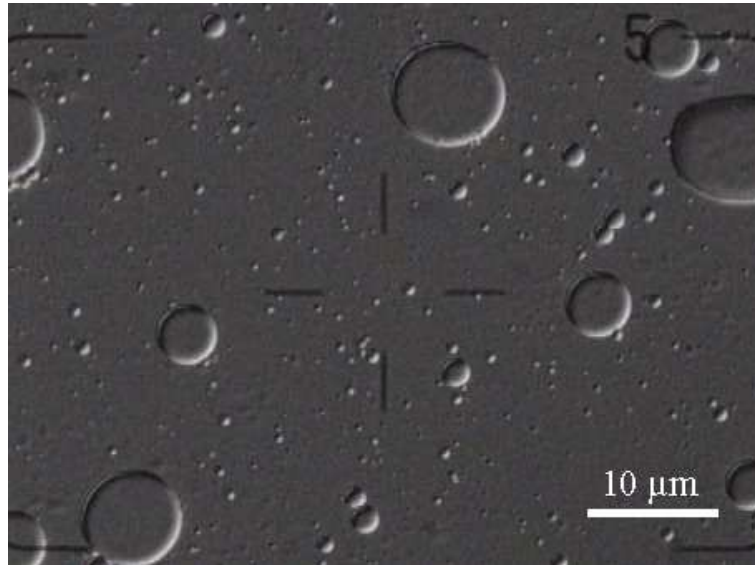


Abbildung 30: Durch Rühren hergestellte Emulsion im Lichtmikroskop
 Lichtmikroskopische Phasenkontrast-Aufnahme einer mit Magnetrührstäbchen hergestellten Emulsion im Mineralöl/Span80/Tween80 System. Die Tröpfchengröße ist sehr heterogen, und es sind sehr große Kompartimente vorhanden. Herstellung: 1 min Rühren, Rührstab 8x3 mm mit Pivotring, Aufnahme: DIC (differential-interference-contrast), 60x Wasser-Immersionsobjektiv

die Scherkräfte des Homogenisators emulgieren, weswegen hier auf die Anwendung von Ultraschall zurückgegriffen wurde.

Die Extraktion von intakter DNA aus den Emulsionen ist für die Amplifikation positiver Varianten innerhalb der evolutiven Runden äußerst wichtig. Experimentell wurde die Rückgewinnung in zwei Schritten erreicht. Zunächst wurden die Wassertröpfchen der Emulsion durch Zentrifugation am Boden gesammelt und der Öl-Überstand entfernt. Aus dem Pellet (intakte Tröpfchen) konnte die DNA durch kommerzielle PCR-Aufreinigungskits zurückgewonnen werden.

Beide untersuchte Emulsionssysteme zeigen eine ausreichend enge Größenverteilung. Sowohl für das Mineralöl- als auch für das Isopar M - System gilt, dass die Größe der Teilchen im optimalen Bereich liegt. Insgesamt ist die Herstellungsmethode durch Homogenisation mit dem Ultra-Turrax hier jedoch der Ultraschallbehandlung vorzuziehen, da Rückgewinnung *intakter* DNA aus der Ultra-Turrax-Emulsion besser verlief. Das Mineralöl-System erfüllt damit alle Voraussetzungen für die Anwendung als Kompartimentierungsmethode im hier entwickelten System zur evolutiven Veränderung der FLP-Rekombinase.

6. PROJEKT A: FLP-REKOMBINASE

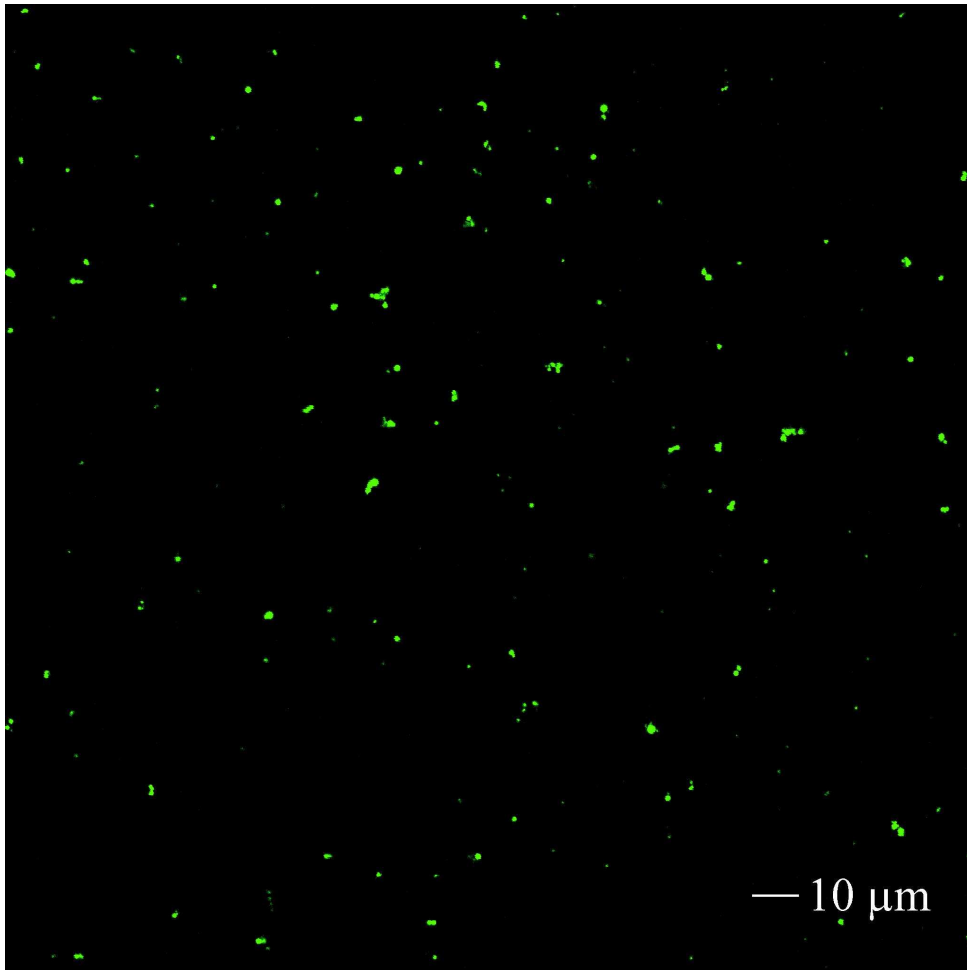


Abbildung 31: Mit Ultra-Turrax hergestellte Emulsion im Laserscan-Mikroskop

Gezeigt ist eine Mineralöl-Emulsion die das Fluorophor Alexa488 in der wässrigen Phase enthält. Dies ist ein Beispiel von Aufnahmen, wie sie zur Analyse der Grössenverteilung gemacht wurden. Scan-Größe 2.048 x 2.048 Pixel (230,3 x 230,3 µm); Auflösung: 0,11 µm pro Pixel; Emulsionsbedingungen: 950 µl Mineralöl/Span80/Tween80 (s. Tab. 14), 50 µl wässrige Alexa488 Lösung (Konz.: 400 nM); Herstellung: 10 sec Ultra-Turrax (T8), Stufe 5 (ca. 21.000 RPM) in 2 ml

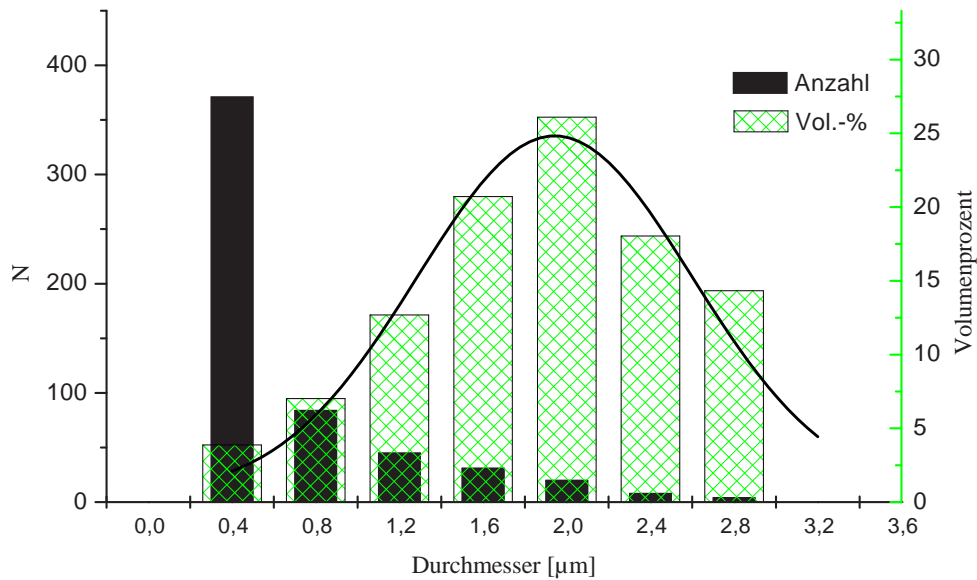


Abbildung 32: **Größenverteilung einer mit dem Ultra-Turrax produzierten Mineralöl-Emulsion**

Zur Bestimmung der Größenverteilung wurden aus je 10 Schicht-Aufnahmen (eine davon wird in Abb. 31 gezeigt) mit $1\ \mu\text{m}$ Abstand in z -Richtung Mittelwert-Bilder errechnet und mit dem Programm ScionImage einer Partikelauswertung unterzogen. Die erhaltenen Flächen wurden unter Annahme einer Kreisform in Durchmesser und Volumen umgerechnet. Hier wurden $N = 563$ Tröpfchen ausgewertet und schrittweise in Kategorien von jeweils $0,4\ \mu\text{m}$ Breite eingeordnet. Aufgetragen ist die reale Anzahl der Tröpfchen (linke Y-Achse) sowie der Anteil der Kategorien am Gesamtvolumen aller Tropfen (Volumen-Prozent, rechte Y-Achse). Die Auftragung ergibt, dass der größte Volumenanteil durch Tröpfchen im $2\ \mu\text{m}$ Bereich repräsentiert wird. Emulsionsbedingungen wie in Abb. 31 angegeben.

6. PROJEKT A: FLP-REKOMBINASE

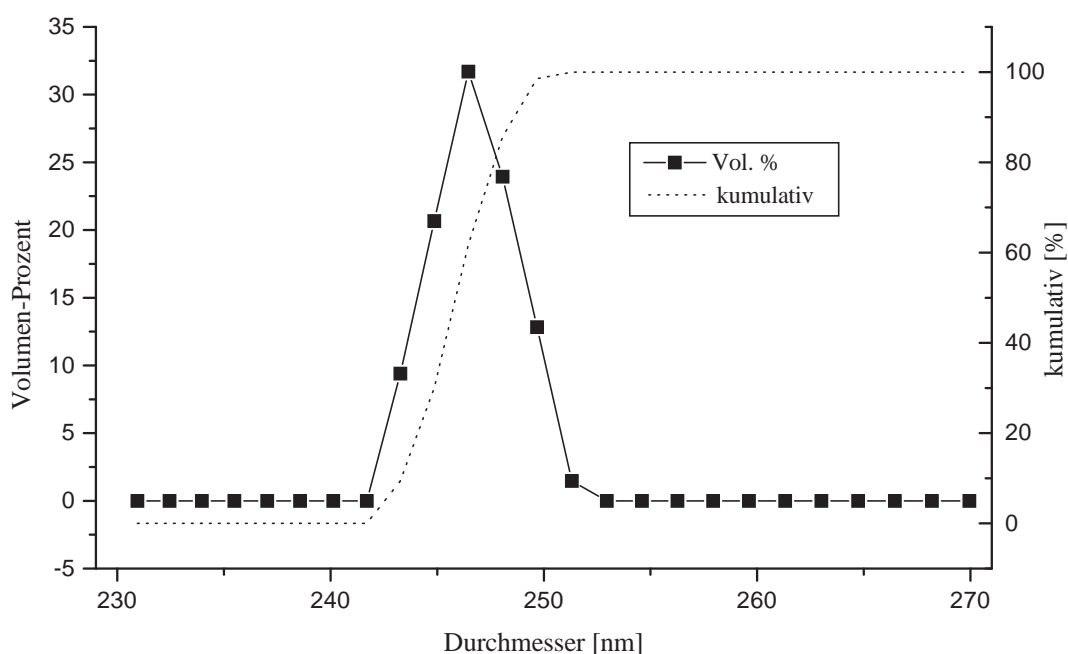


Abbildung 33: Größenverteilung einer durch Ultraschall hergestellten Isoparaffin-Emulsion

Die Analyse der Größenverteilung erfolgte hier durch dynamische Lichtstreuung. Aufgetragen ist der jeweilige Volumenanteil der Tröpfchen am Gesamtvolumen aller Tropfen (Volumen-Prozent, linke Y-Achse) über den Durchmesser der Tröpfchen. Die kumulativen Werte sind durch die gepunktete Linie dargestellt (rechte Y-Achse). Es ist zu erkennen, dass dieses Emulsionssystem aus sehr kleinen, sehr homogenen Tröpfchen besteht. Der größte Volumenanteil liegt im Bereich von $0,246\ \mu\text{m}$, wobei die Größenverteilung sehr scharf ist. Emulsionsbedingungen: $50\ \mu\text{l}$ wässrige Phase, $950\ \mu\text{l}$ Isopar-M (s. Tab. 14); Ultraschall-Behandlung $6 \times 15\ \text{sec}$ auf Eis mit je $10\ \text{sec}$ Pause, Geräteeinstellung (Branson sonifier 250, Mikrotip): Stufe 1, kontinuierlicher Zyklus; Messverdünnung 1:300 in IsoparM; Lichtstreuapparat: AMTEC; Streuparameter: Winkel: 90° , Wellenlänge: $633\ \text{nm}$, $T = 25^\circ\text{C}$, Brechungsindex $1,437$, Viskosität $1,915\ \text{cP}$

6. PROJEKT A: FLP-REKOMBINASE

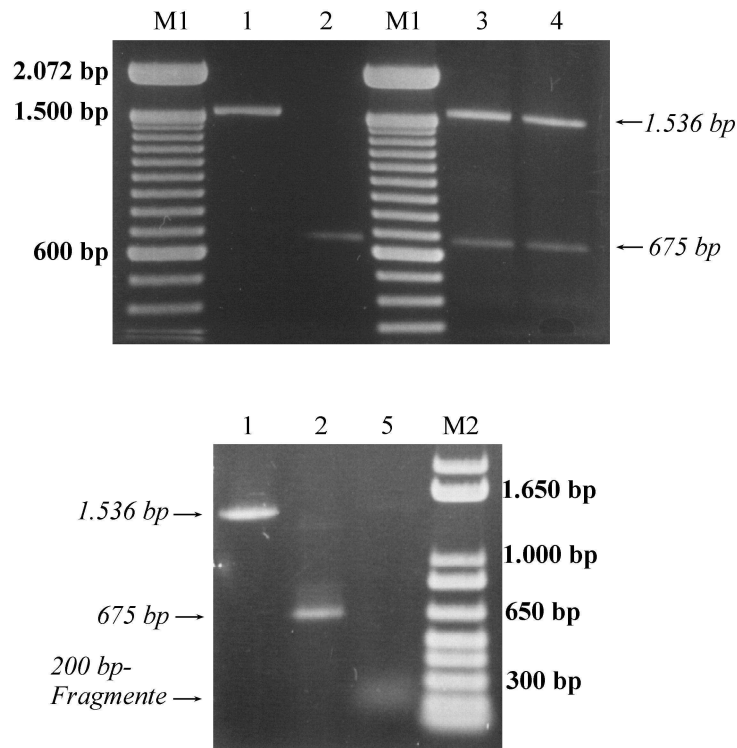


Abbildung 34: **Extraktion von DNA aus Emulsionen**

Zur Überprüfung der Rückgewinnungsrate von DNA aus Emulsionen wurden je 100 fmol zweier 1.536 bp (**Spur 1**) und 675 bp (**Spur 2**) langer linearer DNA Fragmente verwendet; **Spur 3**: Die PCR-Aufreinigung der Mischung beider Fragmente zeigt kaum Verlust; **Spur 4**: Beide Fragmente wurden im molaren Verhältnis 1:1 gemischt, im Mineralöl-Span80-Tween80 System emulgiert und dann durch PCR-Aufreinigung extrahiert, was ebenfalls kaum Verlust zeigt. Emulsionsbedingungen wie in Abb. 32 beschrieben; **Spur 5**: PCR-Extraktion der gleichen Mischung nach Emulgation im Isoparaffin-System durch Ultraschall zeigt nur noch Fragmente im 200 bp-Bereich. Emulsionsbedingungen wie in Abb. 33 beschrieben; M1: 100 bp Marker; M2: 1 Kb+ Marker

6. PROJEKT A: FLP-REKOMBINASE

6.6.3 Experimente zur Etablierung eines System für die gekoppelte *in vitro* Transkription/Translation

Für die *in vitro* Translation wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Ribosomenextrakt aus *E.coli* präpariert [67], der auch als S-30 Extrakt bezeichnet wird. Um als Informationsträger DNA anstatt von mRNA verwenden zu können, wurde die Translation mit der Transkription gekoppelt. Dazu trug hier die eingesetzte DNA einen T7-Promotor, und T7-RNA-Polymerase wurde ebenso zum Ansatz hinzugefügt wie die vier Ribonukleotide. Der Aktivitätsnachweis der gekoppelten Transkription/Translation wurde experimentell in zwei Schritte gegliedert und beinhaltete jeweils Fluoreszenzmarker.

Prinzipien der Beobachtung von Transkription und Translation durch Fluoreszenz Der Nachweis von mRNA kann allgemein durch Hybridisierung mit spezifischen Sonden geschehen. Die oft zur Detektion der gebundenen Sonden genutzte Markierung durch radioaktive Nuklide kann jedoch vermieden werden, wenn die Sonden als molekulare „Leuchtfener“ (*molecular beacons*) konzipiert werden (Abb. 35).

Auch zum Nachweis der Translation kann auf radioaktives Arbeiten verzichtet werden. Die sonst übliche Technik der Autoradiographie nach Inkorporation von ^{35}S -Methionin wurde hier ersetzt durch die Expression autofluoreszenter Proteine, wie z.B. GFP. Die Reaktion kann im Fluorimeter *online* beobachtet werden.

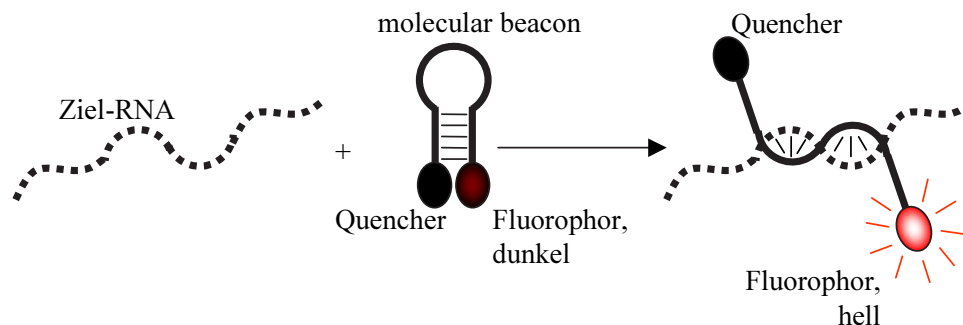


Abbildung 35: **Funktionweise von Molecular Beacons**

Molecular beacons wurden 1996 von Tyagi und Kramer vorgestellt [110] und bestehen aus einem DNA-Oligonukleotid, welches einen intramolekularen Stamm ausbildet. An den 3'- und 5'-Enden sitzen je ein Quencher und ein Fluorophor, die sich im ungebundenen Zustand des Beacons in enger räumlicher Nähe befinden. Bei Hybridisierung des Beacons an komplementäre Ziel-RNA vergrößert sich der Abstand zwischen Fluorophor und Quencher enorm, was zur Aufhebung der Fluoreszenzlöschung führt.

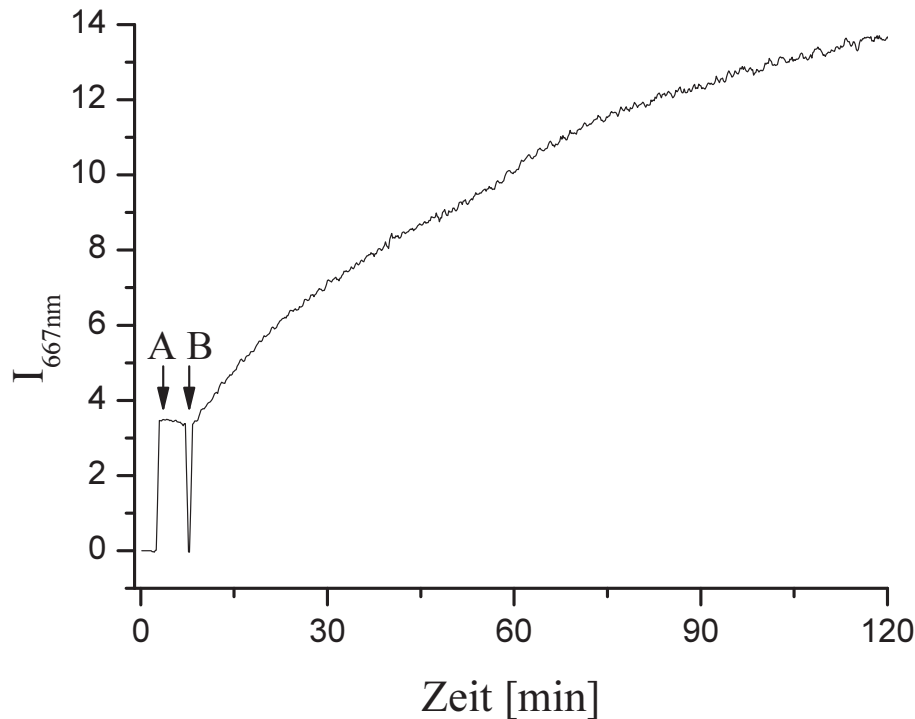


Abbildung 36: Beobachtung von *in vitro* Transkription durch Molecular Beacon in Lösung

Ausgehend *supercoiled* Plasmid mit *T7*-Promotor wurde die Menge der gebildeten *m*-RNA über die Zunahme der *Cy5*-Fluoreszenz des hybridisierenden *molecular beacons* über die Zeit gemessen. **A:** Zugabe des *molecular beacon*; **B:** Zugabe der *T7*-RNA-Polymerase; Reaktionsbedingungen: Template 27 nM; NTP's je 1 mM Endkonzentration; *T7*-RNA-Polymerase 0,67 U/ μ l; *Molecular Beacon* 2 μ M; $T = 37^\circ \text{C}$; Excitation 643 nm; Emission 667 nm;

Ergebnisse der Beobachtung von *in vitro* Transkription in Lösung und in Emulsionen Der hier verwendete *molecular beacon* hatte eine Länge von 25 nt und war 3' mit dem Quencher *Dabcyl* markiert, während an das 5'-Ende der rote Fluoreszenzfarbstoff *Cy5* gekoppelt war. Die Sequenz wurde so gestaltet, dass die jeweils äußeren fünf Nukleotide einen Stamm ausbilden, während die Länge des zur Ziel-RNA komplementären Bereiches mit 15 nt das 1,5-fache einer DNA-Windung entspricht. Damit stehen nach Bindung der Sonde Fluorophor und Quencher in *trans*, wodurch ihr räumlicher Abstand möglichst gross ist. Durch Hybridisierung des *molecular beacons* an ein komplementäres, synthetisches DNA-Oligonukleotid konnte ein Signal-zu-Hintergrund Verhältnis von etwa 1:42 ermittelt werden. Der durch thermische Denaturierung bestimmte Schmelzpunkt des Beacon alleine lag zwischen 70 und 75 $^\circ \text{C}$. Die *in vitro* Transkription von RNA in Lösung konnte durch den *molecular beacon* im Fluorimeter verfolgt werden (Abb. 36).

6. PROJEKT A: FLP-REKOMBINASE

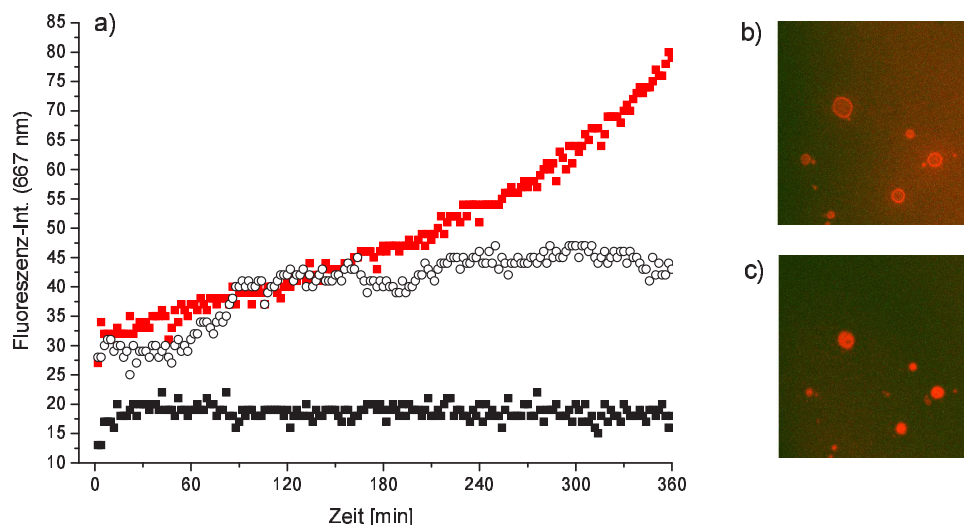


Abbildung 37: **Beobachtung von *in vitro* Transkription durch Molecular Beacon in Emulsionen.**

a: Verfolgung der mRNA-Bildung durch Messung der Cy5-Fluoreszenz des Molecular Beacon in Emulsion. ■ Ansatz mit Beacon und mit Template; ○ Negativkontrolle mit Beacon jedoch ohne Template; ■ Negativkontrolle ohne Beacon aber mit Template; Reaktionsbedingungen wie in Abb. 36 beschrieben; Emulsionssystem: Öl/Span/Tween; Messung der Emulsionen in 96-well Platten im Plattenlesegerät; **b:** Aufnahme einer Emulsion mit Molecular Beacon im Laserscan-Mikroskop zu Beginn der *in vitro* Transkriptions-Reaktion. Es ist deutlich die Lokalisation des Beacon entlang der Phasengrenze zu erkennen. Reaktionsbedingungen wie a), jedoch 100 nM molecular beacon. **c:** wie (b), jedoch nach ca. 30 min Reaktionszeit. Hier kann bereits eine homogene Verteilung des Beacons innerhalb der wässrigen Phase beobachtet werden.

Die in Lösung ablaufende *in vitro* Transkription wurde analog auch in Emulsionen gemessen. Die Emulsionen wurden nach System 1 (Tab. 14) mit dem Ultra-Turrax hergestellt. Für die Demonstration der Transkription durch den Einsatz von *molecular beacons* im Emulsionssystem ist zu berücksichtigen, dass die Sonden einen hydrophilen DNA-Teil sowie einen hydrophoben Kopf besitzen (Abb. 35, S. 98). Sowohl Cy5 als auch Dabcyl sind hydrophob, wie die Strukturformeln erkennen lassen (Abb. 9, S. 38). Dadurch findet eine Lokalisation entlang der Phasengrenze zwischen Öl und Wasser statt (Abb. 37b), und die Fluoreszenzlöschung ist bereits im ungebundenen Zustand etwas herabgesetzt.

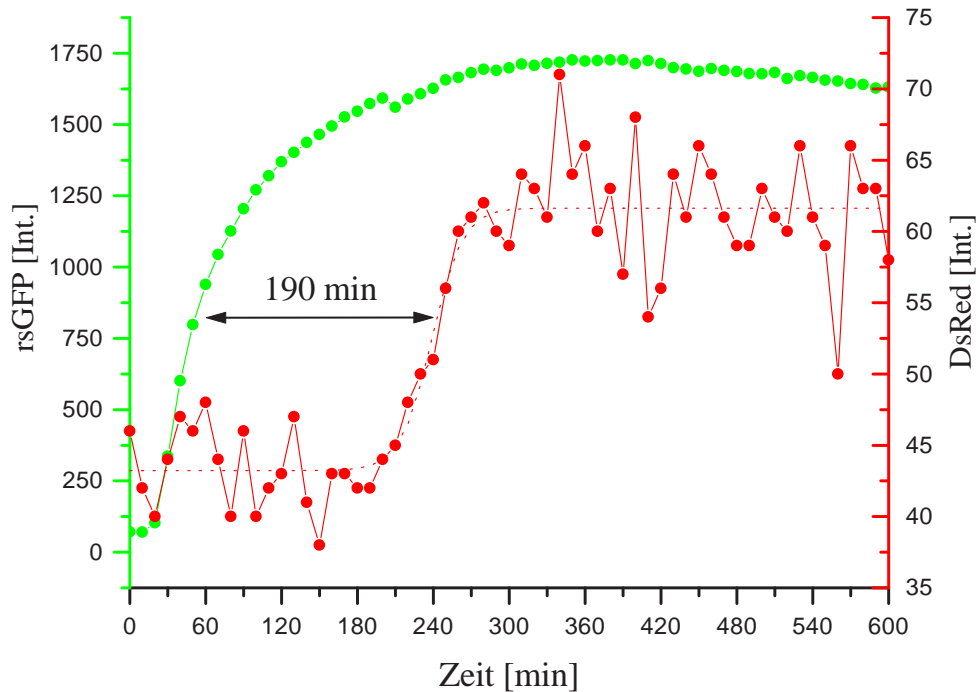


Abbildung 38: **Beobachtung der *in vitro* Expression von rsGFP und DsRed in Lösung**

Die Fluoreszenz des rsGFP (●, linke Y-Achse) tritt bereits ab 30 Minuten auf, während die DsRed-Fluoreszenz (●, rechte Y-Achse) mit einer Verzögerung von ca. 190 min entsteht. Das Signal-zu-Hintergrund Verhältnis ist beim rsGFP deutlich besser als beim DsRed. Messung im TECAN-Plattenlesegerät; Vol. je 50 μ l in 96-well Mikrotiterplatte; $T = 37^\circ \text{C}$; Filter: GFP: Ex. 485 nm; Em. 535 nm; DsRed: Ex. HQ545/30; Em. 595 nm; Template-Konzentrationen (Plasmide mit T7-Promotor) jeweils 27 nM;

Ergebnisse der Beobachtung von gekoppelter *in vitro* Transkription/Translation in Lösung und in Emulsionen Bei der Auswahl eines autofluoreszierenden Proteins zur Messung von Expression muss bedacht werden, dass das erhaltene Fluoreszenzsignal zeitlich die Expression des autofluoreszenten Proteins wiedergibt, wobei die zur Faltung der Polypeptidkette und vor allem zur Reifung des Chromophors benötigte Zeit enthalten ist. So kommt es, dass die Signale verschiedener autofluoreszente Proteine etwa gleicher Größe zeitlich versetzt auftreten können. Hier wurde die gekoppelte *in vitro*-Transkription/Translation der red-shifted Variante des grün fluoreszierenden Proteins (rsGFP) und eines rot fluoreszierenden Proteins (DsRed) im Vergleich gemessen (Abb. 38).

Zur Abschätzung des Verstärkungsfaktors bzw. der Anzahl der gebildeten Proteinmoleküle pro DNA Template Molekül wurde im TECAN-Plattenlesegerät eine Eichreihe

6. PROJEKT A: FLP-REKOMBINASE

mit kommerziell erhältlichem rsGFP-Protein bekannter Konzentration aufgenommen. Ein Vergleich der Effizienz von zirkulären und linearen Templates wurde durch die *in vitro* Expression von rsGFP in Lösung vorgenommen. Dieses Experiment erbrachte unter Anwesenheit eines RNase-Inhibitors für supercoiled Plasmid (pQBI63) einen Verstärkungsfaktor von ca. 46 und für ein lineares rsGFP-Gen (Gel-aufgereinigtes PCR-Produkt von pQBI63 mit T7-Promotor) einen Wert von etwa 8 GFP-Molekülen pro Molekül an DNA-Template.

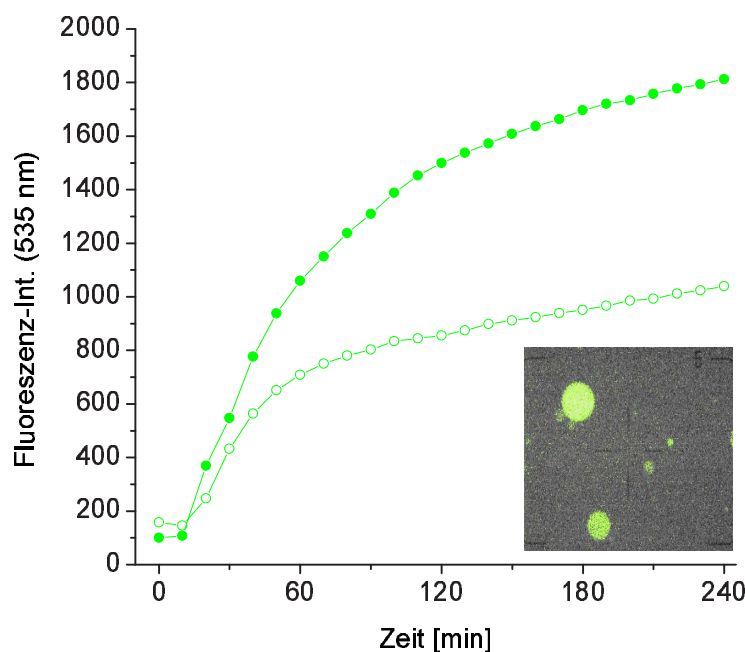


Abbildung 39: *In vitro* Expression von rsGFP in Emulsionen

Messung der rsGFP-Fluoreszenz über die Zeit im Plattenleser. ● Emulsion durch Rühren mit Magnetrührstab hergestellt. ○ Emulgation durch Ultra-Turrax (10 sec, 21.000 RPM). Messung von 200 μ l Emulsion in 96-well Platte; Messparameter und Templatekonzentration wie in Abb. 38 erläutert. **Inset:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Emulsion nach Ablauf der *in vitro* Translation von rsGFP.

Eine Beobachtung der *in vitro* Expression von rsGFP mit Hilfe des hier präparierten S30-Extraktes erfolgte auch in Emulsionen. Für einen Vergleich der Effizienzen zwischen der Expression in Lösung und in Emulsionen ist zu beachten, dass bei Fluoreszenzmessungen von Emulsionen im Fluorimeter zusätzliche Effekte wie Streuung und Sedimentation der Tropfen eine Rolle spielen. Die Expression von rsGFP in Emulsionen konnte hier sowohl durch die zeitliche Registrierung der Fluoreszenzintensität im Plattenlesegerät als auch durch Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden (Abb. 39). Die Emulgiermethode hat da-

bei einem deutlichen Einfluss auf die *in vitro* Translationseffizienz. Durch Verwendung des Ultra-Turrax konnte eine optimale Größenverteilung (Abb. 31 und 32) erreicht werden, was für die Anwendung in der Evolution das deutlich wichtigere Kriterium ist, als optimale Expressionseffizienzen. Die hier beobachtete Aktivität der Ultra-Turrax-Emulsion ist völlig ausreichend, wenngleich auch geringer als die der durch Rühren hergestellte Emulsion.

6.6.4 Ergebnisse der experimentellen Überprüfung des Konzeptes der Genotyp-Phänotyp-Kopplung

Test mit von außen zugefügtem FLP Das Funktionsprinzip der Markierung des FLP-Genotyps durch Zirkularisierung nach erfolgreicher Rekombination durch den aktiven Phänotyp (Abb. 29, S. 90) wurde hier zunächst ohne *in vitro* Expression, sondern mit von außen zugegebenem FLP-Protein überprüft. Dadurch konnte die Sensitivität der Detektions-PCR getestet werden. Zu diesem Zweck wurde das Substrat mit zwei FRT-sites gemäß Abb. 29 mit einem 25fachen Überschuß an FLP pro FRT-halfsite in FLP-Puffer 6 umgesetzt. Die extrahierte Gesamt-DNA wurde in einer Verdünnungsreihe als Template für die Detektions-PCR eingesetzt (Abb. 40).

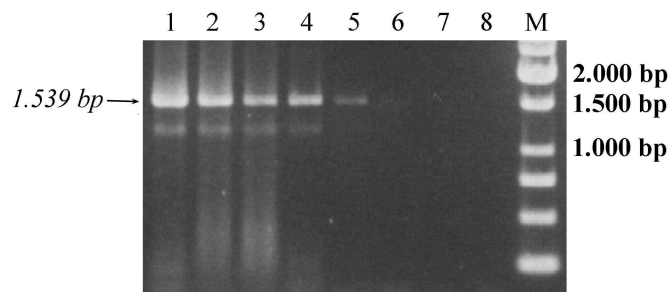


Abbildung 40: **Detektions-PCR nach Rekombination mit von außen zugeführtem FLP**

Von 10 μl extrahierter Gesamt-DNA wurden 9 μl unverdünnt für die Detektions-PCR eingesetzt (**Spur 1**). Die Template-Verdünnungsreihe wurde in 10er Schritten von 1:10 bis hin zu 1:10⁷ pipettiert (**Spuren 2-8**). Eine Negativkontrolle nur mit Rekombinations-Edukt erbringt kein PCR-Produkt (Daten nicht gezeigt). M: GeneRuler 1 kb Marker;

Bei der hier eingesetzten DNA-Konzentration von 0,4 nM und einem Reaktionsvolumen von 50 μl ergibt sich eine Gesamtzahl von $1,2 \times 10^9$ Eduktmolekülen. Liegt das Reaktionsgleichgewicht der Rekombination in der Mitte, wären 6×10^8 zirkuläre Rekombinationsprodukte zu erwarten. Die in Abb. 40 gezeigte Detektions-PCR lieferte bis zu einer Verdünnung von 1 zu 10⁴ ein Signal. Das bedeutet für die hier vorgenommene

6. PROJEKT A: FLP-REKOMBINASE

Abschätzung, dass ca. 60.000 Template-Moleküle durch eine Amplifikation mit 30 Zyklen erfasst wurden, was ein durchaus realistischer und üblicher Wert ist. Damit gilt die Detektions-PCR als empfindlich genug.

Test mit im Ansatz *in vitro* translatiertem FLP In diesem Experiment wurde die *in vitro* Expression von aktiven und inaktiven FLP-Varianten in getrennten Ansätzen vorgenommen und untersucht, ob eine Unterscheidung beider Varianten durch Detektions-PCR nach Genotyp-Phänotyp-Kopplung möglich ist.

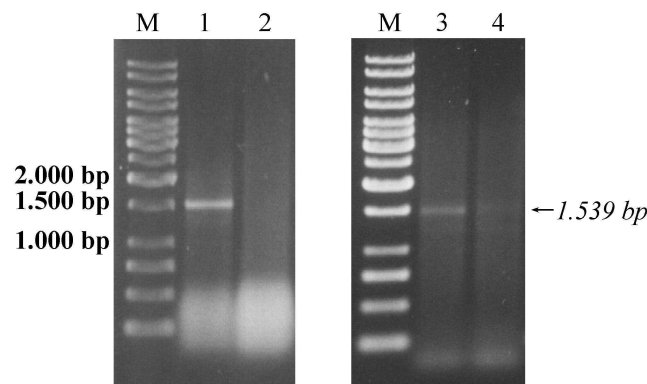


Abbildung 41: **Detektions-PCR nach Rekombination mit im Ansatz *in vitro* translatiertem FLP – in Lösung und in Emulsionen** Die beiden Konstrukte *wt-FLP* und *Y343S-FLP* wurden in zwei getrennten Gefäßen *in vitro* exprimiert und somit der Genotyp-Phänotyp-Kopplung nach dem oben vorgestellten Konzept unterworfen. Beide Konstrukte enthielten die *wt-FRT-site*. Nach der Inkubation wurde die DNA extrahiert und eine Detektions-PCR mit den Primern *Ev4FLP1* und *Ev4FLP2* zur Amplifikation des zyklischen *Excisionsprodukts* gefahren. **links:** Ansätze in Lösung; Spur 1: im *wt-FLP*-Ansatz kann die erfolgreiche Rekombination mit dem 1.539 bp PCR-Produkt nachgewiesen werden; Spur 2: im *Y343S-FLP*-Ansatz entsteht kein Produkt; **rechts:** Ansätze wie links, jedoch in Emulsion; Spur 3: der *wt-FLP*-Ansatz erzeugt auch in Emulsion aktives FLP, dessen Rekombinationsprodukt ebenfalls durch das 1.539 bp PCR-Produkt nachgewiesen werden kann; Spur 4: der *Y343S-FLP*-Ansatz zeigt in Emulsionen keine Aktivität; M: GeneRuler 1 kb Marker

Als aktive Variante wurde das FLP-Gen verwendet, welches für den *wt-FLP* Phänotyp codiert. Die Simulation der inaktiven Variante erfolgte mit dem Gen für *Y343S-FLP*, einer in der Literatur häufig verwendeten Rekombinations-defizienten Mutante [84], bei der das für den Mechanismus wichtige Tyrosin an Position 343 durch Serin ersetzt wird. Beide Gene waren Codon optimiert für *E.coli* (Abschnitt 6.2). Bei der Herstellung der Konstrukte für die Genotyp-Phänotyp-Kopplung (Abb. 29) wurden die FRT-sites in ihrer

wt-Sequenz (Abb. 10a) eingebracht. Die *in vitro* Expression erfolgte zu einem direkt in Lösung, zum anderen nach vorhergehender Emulgation (Abb. 41).

Wie in Abbildung 41 gezeigt wird, ist *in vitro* translatiertes FLP sowohl in Lösung als auch in Emulsion aktiv, und die Menge des gebildeten FLP-Enzyms reicht für die hier konzipierten Evolutionsstrategien vollkommen aus. Die Faltung des FLP-Proteins verläuft demnach korrekt. Die Pufferbedingungen des S30-Extraktes und des Reaktionsmixes sind für die durch FLP katalysierte Rekombination geeignet, so dass die vorgeschlagene Genotyp-Phänotyp-Kopplung direkt im Translationsansatz möglich ist. In der Emulsion enthaltene Detergenz- und Öl-Komponenten sind in Bezug auf die FLP-Aktivität als inert anzusehen. Die verwendete niedrige Substratkonzentration von 400 pM stellt kein Hindernis für die Substraterkennung und -bindung sowie den *intramolekularen* Umsatz dar. Diese Konzentration entspricht derjenigen, die notwendig ist, um in Emulsionen mit 2 μm mittlerem Tröpfchendurchmesser statistisch ein Template pro Kompartiment zu erhalten.

Durch Detektions-PCR konnte die aktive (wt-) FLP-Variante von der inaktiven (Y343S) Variante ganz deutlich unterschieden werden. Die entwickelte Gesamtstrategie zur Selektion von FLP-Varianten basierend auf einer Kombination von Kompartimentierung, *in vitro* Expression und Genotyp-Phänotyp-Kopplung mit anschließender Detektions-PCR funktioniert demnach gut.

6.6.5 weiterführende Experimente

Weiterführende Experimente zur Bestimmung der Selektionsleistung des Systems sind jetzt noch erforderlich. Dazu sind zunächst Mischungen von aktiven und inaktiven FLP-Varianten in der Emulsion einzusetzen, um zu testen bis zu welchem Hintergrund an negativen Spezies noch positive detektiert werden können. Bei Sequenzierung der amplifizierten Gene ergeben sich dann gleichzeitig auch Hinweise auf die Trennleistung der Emulsion.

Für die Anwendung des gesamten System zur evolutiven Veränderung von FLP muss als einzige Technik noch die Fehler erzeugende (*error prone*) PCR hinzugenommen werden, für die verlässliche Protokolle existieren [17, 68]. Dieser Schritt kann direkt bei der Generierung der Substrate eingebaut werden.

7 Projekt B: Topoisomerase II

Topoisomerase II und Tumorthherapie

Als Informationsträger und Biopolymer liegt DNA in der Zelle in verschiedenen topologischen Zuständen vor. Die Änderung dieser DNA-Topologie ist essentiell wichtig für viele Prozesse wie Transkription, Replikation oder Kondensation von Chromosomen und wird durch DNA-Topoisomerasen katalysiert [78, 118, 119]. Es sind Topoisomerasen des Typs I und II zu unterscheiden [9], wobei sich alle folgenden Ausführungen und die Experimente dieser Arbeit mit der Topoisomerase II beschäftigen. Dieses Enzym wird in proliferierenden Zellen, zu denen besonders Krebszellen gehören, in hohem Maße benötigt und gebildet. Die Hemmung von Topoisomerase II hat sich als ein wirksamer Angriffspunkt für die Therapie von etlichen unterschiedlichen Tumoren erwiesen [57, 107, 117]. Nun ist es jedoch nicht so, – wie man leicht denken könnte – dass die reine Inhibierung der Topoisomerase-Aktivität unmittelbar zum Absterben der Zellen führt. Ein Teil der Inhibitoren, die *in vitro* die Topoisomerase II effizient blockieren, haben sich *in vivo* als völlig wirkungslos erwiesen [117]. Die tatsächlichen Verhältnisse gestalten sich also etwas komplizierter.

Der Grund für die unterschiedliche Wirksamkeit von Substanzen ist, dass es zwei verschiedene Arten von Topoisomerase-Inhibitoren gibt (Abschnitt 7.1). Die Klassifizierung der Inhibitoren erfolgt dabei anhand der Angriffsstelle innerhalb des katalytischen Zyklus der Topoisomerase II (s.u.).

Da die Inhibitoren der beiden Klassen völlig unterschiedliche pharmakologische Bedeutung haben, existiert ein grosses Interesse an der Entwicklung von Screening-Methoden, die die Entdeckung *und* Klassifizierung von neuen Topoisomerase II Inhibitoren ermöglichen. In der Literatur wird eine Reihe von Ansätzen beschrieben [7, 43, 109], die jedoch alle in einem oder mehreren Punkten unbefriedigend erscheinen. Besonders das Erfordernis des hohen Probendurchsatzes bereitet mit den bisher angewandten Methoden oft Probleme, da häufig Separationstechniken wie z.B. Elektrophorese oder Chromatographie zum Einsatz kommen.

Im Rahmen dieser Arbeit hingegen wurde ein Topoisomerase-II-Inhibitionsassay entwickelt, welches gut zum Einsatz der Zweifarben-FCS als alternative Detektionsmethode geeignet ist. Die Einführung in den katalytischen Zyklus und die detaillierte Beschreibung der Inhibitor Klassen erfolgt im folgenden Abschnitt 7.1. Das entwickelte Assay, die Strategie dahinter sowie die verwendeten Substrate und Modellsubstanzen werden unter Punkt 7.2 erklärt. Die Messergebnisse der Kreuzkorrelationsanalyse werden schließlich im Abschnitt 7.3 gezeigt.

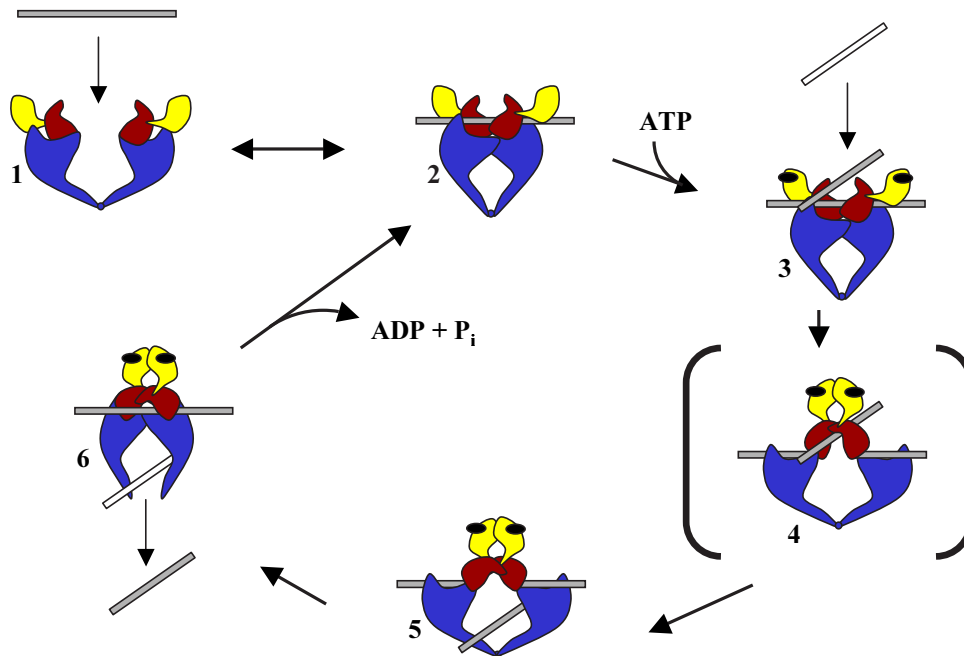


Abbildung 42: **Topoisomerase II: Modell des katalytischen Zyklus**

Die drei Untereinheiten sind farbig abgebildet, wobei diejenige mit ATPase-Aktivität gelb dargestellt ist. 1 und 2: reversibles Binden des ersten DNA-Substrates; 3: nach Bindung von ATP kann das zweite Substrat gebunden werden; 4: der Übergangszustand: nach Konformationsänderung liegt das erste Substrat gespalten vor und ist kovalent an die Topoisomerase gebunden, während das zweite Substrat intakt ist und im Protein-DNA-Komplex fest - jedoch nicht kovalent - gebunden vorliegt; 5: das zweite Substrat wird durch den Spalt im ersten Substrat transportiert; 6: mit Freigabe des zweiten Substrates und Religation des ersten Substrates schließt sich unter Abgabe von ADP und P_i der katalytische Zyklus

7.1 Eigenschaften von Topoisomerase II und ihrer Inhibitoren

Der katalytische Zyklus der DNA-Topoisomerase II ist in Abb. 42 dargestellt. Das im Zellkern lokalisierte Enzym katalysiert die Katenierung/Dekatenierung zweier DNA-Doppelstränge. Während der Reaktion wird in ein DNA-Substrat vorübergehend ein Doppelstrangbruch eingeführt, durch den das zweite DNA-Substrat geführt wird. Seinem Mechanismus entsprechend hat das Enzym eine Bogen- bzw. Tor-förmige Struktur und besteht aus einem Dimer mit jeweils drei Untereinheiten pro Monomer [8, 10, 11]. Eine der Untereinheiten besitzt eine ATPase-Aktivität. Der eigentliche Mechanismus verläuft ähnlich wie der der FLP-Rekombinase über einen nukleophilen Angriff durch Tyrosin-OH. Jedoch wird nur ein Substrat geschnitten, und die 5'-OH Enden der DNA greifen nicht an einem anderen Strang an (Rekombination) sondern am eigenen (Religation). Die Topo-

7. PROJEKT B: TOPOISOMERASE II

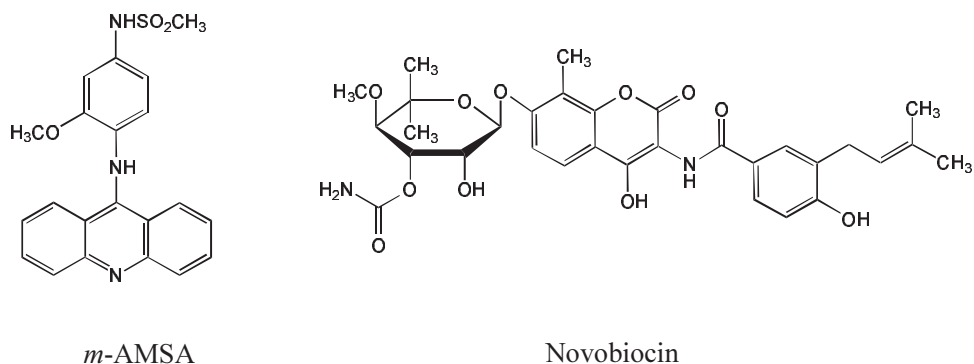


Abbildung 43: **Strukturformeln der verwendeten Topoisomerase-Inhibitoren**

isomerase II Reaktion läuft unter ATP-Verbrauch ab, während die FLP-Rekombination unabhängig von ATP ist. Auch die Übergangszustände sowie die Strukturen der Enzyme unterscheiden sich.

Inhibitoren der Topoisomerase II

Es sind etliche Inhibitoren bekannt, die die Reaktion der DNA-Topoisomerase II blockieren. Je nach Angriffspunkt innerhalb des katalytischen Zyklus werden die Inhibitoren in zwei verschiedene Klassen eingeteilt. Die erste Klasse von Inhibitoren wird als **katalytische Inhibitoren** bezeichnet [2], sie enthält Substanzen, die den katalytischen Zyklus *vor* der Bildung des Übergangszustandes blockieren. Im Gegensatz dazu steht eine Klasse von Substanzen, welche den Übergangszustand (Nr. 4 oder Nr. 5 in Abb. 42) zu stabilisieren vermögen. Solche Hemmer werden **Topoisomerase-Gifte** genannt. Die Topoisomerase-Gifte sind von besonders großem Interesse in der Pharmakologie, denn sie gelten als Zytostatika und werden in der Tumorbehandlung eingesetzt. Die Blockierung der Religation durch Topoisomerase-II-Gifte führt zur Akkumulation des Übergangszustandes. Dieser große, kovalente DNA-Protein-Komplex stellt jedoch eine massive DNA-Schädigung mit Strangbruch dar, die über DNA-Reparatursysteme letztendlich zur Apoptose der betroffenen Zelle führt, wobei der genaue Mechanismus noch nicht im Detail aufgeklärt ist [55].

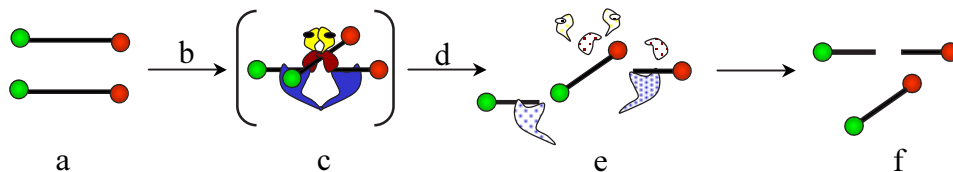
Es sind einige Topoisomerase-Gifte bis hin zum Medikament entwickelt worden, andere befinden sich in den klinischen Testphasen [44]. Pharmakologisch stellen *katalytische Inhibitoren* und *Topoisomerase-Gifte* Antagonisten dar, da sie gegenläufige Effekte hervorrufen. Zytostatisch besonders wirksam sind die *Topoisomerase-Gifte*, während sich manche *katalytische Inhibitoren* in klinischen Studien als nicht zytotoxisch gezeigt haben und teilweise sogar zur Verminderung von Nebenwirkungen der Topoisomerase-Gifte verabreicht werden.

	katalytische Inhibitoren	Topoisomerase-Gifte
Wirkungsweise:	blockieren die DNA-Bindung	hemmen die Religation,
Übergangszustand:	wird nicht gebildet	akkumuliert
Beispiele:	Novobiocin	<i>m</i> -AMSA
	Merbarone	Etoposid
	Bisdioxopiperazine (ICRF-187)	Doxorubicin
	Fostriecin	Actinomycin D
	Aclarubicin	cis-Platin

Tabelle 15: *Topoisomerase-II-Inhibitoren*

7.2 Konzept des Topoisomerase II Inhibitionsassays für die Zweifarben-FCS

Die Basis für die Identifizierung von *Topoisomerase-Giften* ist es, innerhalb des katalytischen Zyklus die pharmakologisch bedeutende Akkumulation des Übergangszustandes nachzuweisen. Da bei der Zweifarben-FCS messtechnisch der Anteil zweifarbig markierter Spezies vom Hintergrund der einfarbigen Moleküle isoliert werden kann, ist die Trennung zweier verbundener Fluorophore sensitiv detektierbar. Diese Tatsache wurde zur Messung der Akkumulation des Übergangszustandes ausgenutzt, denn dieser enthält ein gespaltenes Substrat, welches vorher intakt war.

Abbildung 44: *Das Prinzip des Topoisomerase-II-Inhibitionsassays*

a: die Substrate in einem Puffer mit ATP; **b:** Zugabe von Topoisomerase II und *m*-AMSA; **c:** Akkumulation des intermediären Komplexes; **d:** Zugabe von Proteinase K; **e:** Zerfall des Komplexes und Abbau der Proteinkomponente; **f:** freigelegte DNA

Die Substrat-Moleküle ergeben eine Ausgangs-Kreuzkorrelationsamplitude, die abnimmt, wenn die doppelt markierten DNA-Moleküle geschnitten werden. Da die Spaltung alleine zur Detektion nicht ausreicht, sondern die Bruchstücke wirklich unabhängig voneinan-

7. PROJEKT B: TOPOISOMERASE II



Abbildung 45: *DNA-Substrat für das Topoisomerase-II-Inhibitionsassay*

der diffundieren müssen, muss berücksichtigt werden, dass die Topoisomerase II kovalent über Phosphotyrosyl-Bindungen mit den 5'-Enden der gespaltenen DNA verbunden bleibt. Diese unabhängige Diffusion wurde ähnlich wie bei der FLP-Rekombinase durch den proteolytischen Verdau der Proteinkomponente (Topoisomerase) des Protein-DNA-Komplexes erreicht. So konnte nach Zugabe von Proteinase K die DNA freigelegt und durch Kreuzkorrelationsanalyse beurteilt werden, zu welchem Anteil Doppelstrangbrüche vorlagen.

Voraussetzung für die Realisierung dieses Messkonzeptes ist die zweifarbige Markierung des DNA-Substrates. Das Substrat wurde durch Hybridisierung der komplementären Oligonukleotide RG-TOPO-up und Cy5-TOPO-down erzeugt, welche jeweils am 5'-Ende mit den synthetischen Fluorophoren *Rhodamine green* bzw. *Cy5* markiert als Auftragssynthese bezogen wurden. Die Sequenz des 38 bp langen, linearen Substrates wurde aus der Publikation von Freudenreich und Kreuzer 1994 übernommen, die dieser Sequenz eine besonders gute, von *m*-AMSA induzierbare Spaltbarkeit durch Topoisomerase II zuschreibt [33]. Für die Messungen im Rahmen dieser Arbeit wurde aus T4-Phagen isolierte ³DNA-Topoisomerase-II verwendet. Diese kann als Modell für andere aus Säugetierarten (mammalian) stammende Topoisomerasen betrachtet werden [65, 66]. Als bekannter, kommerziell erhältlicher *katalytischer Inhibitor* der Topoisomerase II gilt Novobiocin, welches ein ATP-Analogon darstellt und durch Konkurrenz mit ATP die Bindung von DNA an das Enzym hemmt [36, 39, 76, 105]. Die in der Literatur beschriebene und häufig als *Topoisomerase-Gift* eingesetzte Substanz *m*-AMSA (Amsacrine) ist ebenfalls kommerziell erhältlich [16, 102, 112].

Mit den beiden verschiedenen Inhibitor-Typen Novobiocin und *m*-AMSA (Abb. 43) wurde das vorgestellte Konzept zur Identifizierung neuer Topoisomerase-II Hemmer experimentell etabliert. Je nach Inhibitor sind dabei drei Situationen denkbar:

- Mit einer wirkungslosen Substanz (oder auch unter Abwesenheit jeglichen Inhibitors) wird der katalytische Zyklus (Abb. 42) durchlaufen, wobei Doppelstrangbrüche immer nur vorübergehend entstehen. Der Anteil des Übergangszustandes ist dabei sehr klein, was sich in einer geringen Abnahme der Kreuzkorrelations-Amplitude nach Proteinase K Verdau bemerkbar macht.
- Unter Einwirkung eines *Topoisomerase-Giftes* wie z.B. *m*-AMSA akkumuliert der

³Geschenk von Dr. K. Kreuzer, Duke University, Durham, NC, USA

Protein-DNA-Komplex des Übergangszustandes. Proteolyse mit Proteinase K kann dann maximal zu einer Abnahme der Kreuzkorrelationsamplitude $G(0)$ von 50 % gegenüber des Ausgangswertes führen, da immer nur eines der beiden Substrate geschnitten wird.

- Ein *katalytischer Inhibitor* wie z.B. Novobiocin ruft eine schwache bis gar keine Änderung in $G(0)$ hervor, da die Substrate von der Topoisomerase nicht gespalten werden.

7.3 Messergebnisse zur Unterscheidung verschiedener Topoisomerase-II Inhibitoren durch Zweifarben-FCS

Die experimentelle Überprüfung der drei vorgestellten Situationen erfolgte im ConfoCor2. Als Substrat diente die in Abbildung 45 vorgestellte, kurze lineare DNA. Die Reaktionsbedingungen orientierten sich an dem von Freudenreich und Kreuzer beschriebenen Protokoll [33]. Da die dort verwendete Substratkonzentration von 100 nM etwas zu hoch für die FCS-Messung ist, wurde eine Mischung aus 50 nM ungelabeltem und 50 nM doppelt gelabeltem Substrat verwendet. Für die Beobachtung von relativen Änderungen in der Kreuzkorrelationsamplitude ist es unerheblich, zu welchem Anteil vollständig ungelabelte Moleküle vorliegen.

Die Abbildung 46 zeigt sehr schön, dass das hier entwickelte Assay zur Unterscheidung verschiedener Topoisomerase II Inhibitoren funktioniert. Es wird zunächst deutlich, dass im normalen katalytischen Zyklus der Topoisomerase im Mittel etwa 15 % der Protein-DNA-Komplexe ein Substrat im geschnittenen Zustand enthalten. Durch den Verdau mit Proteinase K verschiebt sich die Lage der Kurven nach links, was durch die schneller diffundierende DNA erklärt werden kann. Die zusätzlich vorgenommene Auswertung der Autokorrelationskurven des grünen Kanals ergab eine Abnahme der Diffusionszeiten τ_D um den Faktor 1,66 nach Proteinase K Verdau. Damit ist zum einen bewiesen, dass die DNA unter Normalbedingungen an die Topoisomerase II gebunden ist. Zum anderen wird dadurch natürlich auch die Aktivität der Proteinase K bestätigt. Dies dient quasi als interne Kontrolle, denn der proteolytische Verdau ist eine wesentliche Komponente der gesamten Assay-Strategie (Abb. 44). Ohne Verdau durch Proteinase K verändern sich die Kreuzkorrelationskurven nicht (Daten nicht gezeigt).

Der normale Anteil an Übergangszuständen von 15 % verändert sich durch die Anwesenheit der beiden verwendeten Inhibitoren in völlig verschiedener Weise. Der *katalytische Inhibitor* Novobiocin senkt den Grundanteil an Komplexen auf fast Null ab. Unter Einwirkung dieser Substanz bleibt die Kreuzkorrelation des Substrates vor und nach der Reaktion konstant (Abb. 46b). Das bedeutet, dass Novobiocin die Bildung des Übergangszustandes vollständig verhindert. Ein zusätzlicher Vergleich der Lage der Kurven

7. PROJEKT B: TOPOISOMERASE II

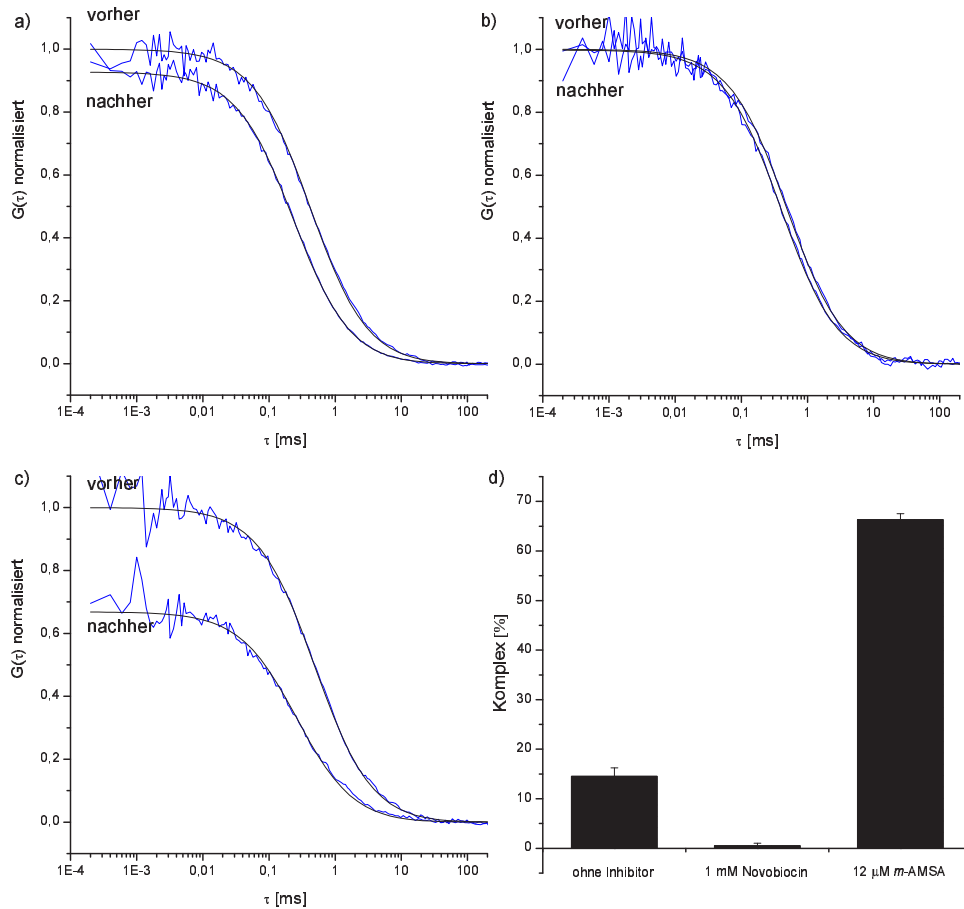


Abbildung 46: Unterscheidung verschiedener Topoisomerase-II Inhibitoren durch Zweifarben-FCS Messungen

Dargestellt sind jeweils Messungen direkt nach Ansetzen der Reaktion (vorher) und nach Inkubation und Verdau mit 1 U Proteinase K (nachher). blau: Kreuzkorrelationskurven; schwarz: Fit anpassungen; Reaktionsbedingungen: 50 nM unmarkiertes Substrat, 50 nM doppelt markiertes Substrat, 400 nM T4-Topoisomerase-II; Messzeit 10 x 10 sec; Die dargestellten Kurven sind Mittelwerte aus jeweils zwei unabhängigen Messungen; **a)** mit 12 μM m-AMSA; **b)** mit 1 mM Novobiocin; **c)** ohne Inhibitor; **d)** Der mittlere Anteil von Übergangszustand-Komplexen wurde aus der Abnahme der Kreuzkorrelation berechnet, wobei berücksichtigt wurde, dass die Amplituden $G(0)$ maximal auf 50 % des Ausgangswertes fallen können.

7. PROJEKT B: TOPOISOMERASE II

vorher und nachher zeigt, dass sich die Diffusionszeiten kaum ändern. Hier ergab die τ_D Bestimmung durch Fitpassung der Autokorrelationskurven (grün) eine Abnahme um den Faktor 1,08. Dies deutet darauf hin, dass durch Novobiocin nicht nur die Komplexbildung verhindert wird, sondern auch die Anlagerung der Topoisomerase II an das Substrat minimiert wird. Da die Substratbindung ein ATP-abhängiger Prozess ist (Abb. 42), entsprechen die hier gemachten Beobachtungen für das ATP-Analogon Novobiocin dem in der Literatur angegebenen Wirkmechanismus über Konkurrenz mit ATP um die Bindungsstelle an der ATPase-Untereinheit.

Das *Topoisomerase-Gift m*-AMSA bewirkt eine wesentlich stärkere Absenkung der Kreuzkorrelationsamplitude (Abb. 46c). Der gemessene Anteil an Komplexen, die ein geschnittenes Substrat tragen, erhöht sich hier auf 66 %. Dieser hohe Wert zeigt, dass viel mehr Substrate in geschnittener Form vorliegen, als es ohne Inhibitor der Fall ist (dort: 15 %). Dadurch wird die durch Topoisomerase-Gifte stattfindende Akkumulation der Intermediate sehr schön belegt. Die zusätzliche Auswertung der Diffusionszeiten aus den zugehörigen Autokorrelationskurven (grüner Kanal) ergeben hier eine Abnahme um den Faktor 1,69 nach Verdau durch Proteinase K. Dieser Wert entspricht ziemlich genau dem für die Situation ohne Inhibitor gefundenen Faktor. Die absoluten Diffusionszeiten τ_D für die vorher-Messungen mit *m*-AMSA und ohne Inhibitor sind mit 0,176 ms identisch. Dies zeigt, dass die DNA auch im normalen katalytischen Zyklus von der Topoisomerase II vollständig bedeckt ist, denn die Akkumulation der Intermediate durch *m*-AMSA führt zu keiner weiteren Massenzunahme der gebundenen Substrate gegenüber der Situation ohne Inhibitor. Auch nach Proteinase K Verdau sind die τ_D fast identisch für die Ansätze mit und ohne Inhibitor, und besitzen Werte von etwa 0,105 ms. Dies zeigt, dass dann überall nur noch freie DNA vorliegt. Der etwas höhere Anteil an gespaltenen DNA im *m*-AMSA-Ansatz gegenüber dem Ansatz ohne Inhibitor kann gemäß Gl. (6) durch den geringen Massenunterschied zwischen gespaltenem und ungespaltenem Substrat in der Autokorrelationsanalyse hier nicht aufgelöst werden.

Die Daten zeigen insgesamt, dass die hier entwickelten Methode für die Unterscheidung verschiedener Topoisomerase-Inhibitor-Typen sehr gut geeignet ist.

7. PROJEKT B: TOPOISOMERASE II

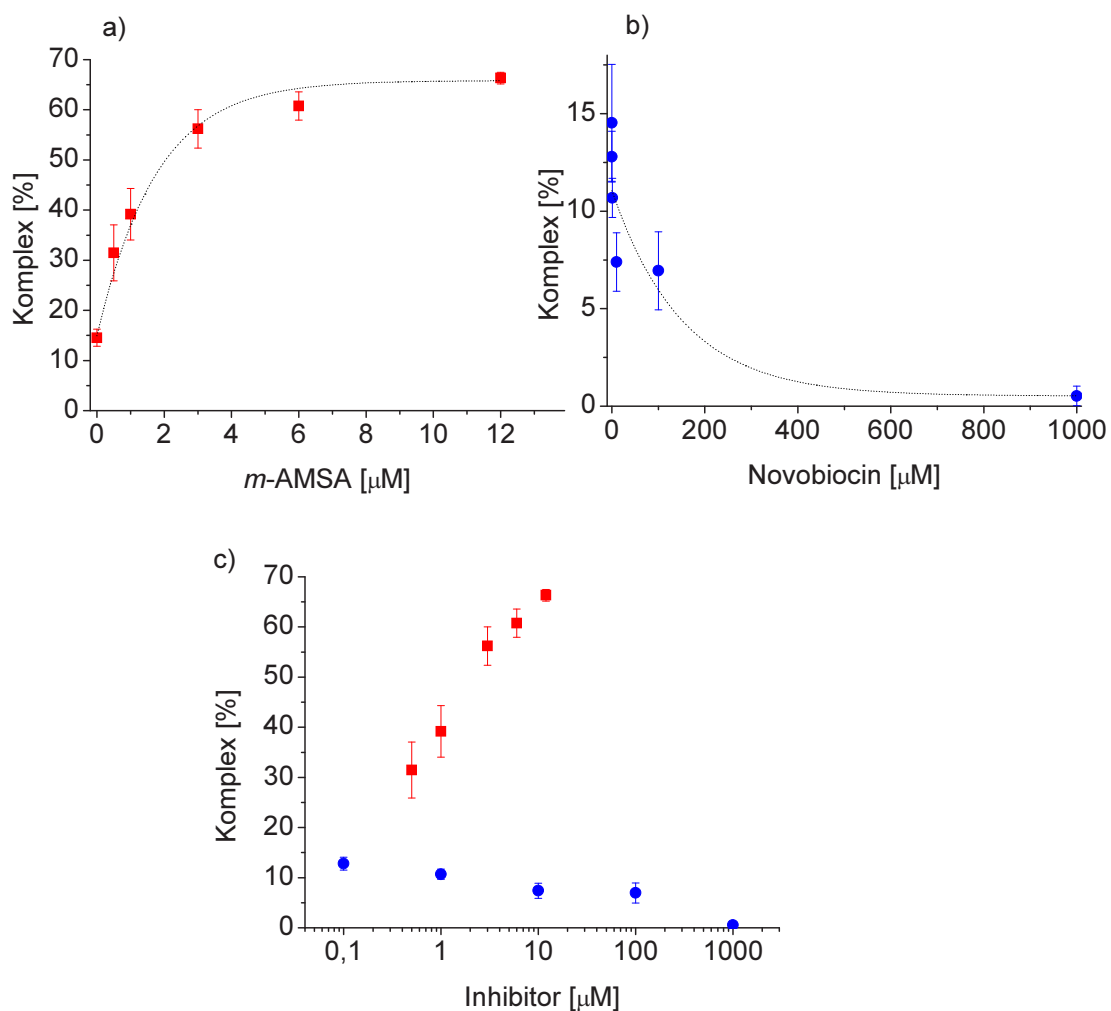


Abbildung 47: **Konzentrationsreihen von m-AMSA und Novobiocin**

a: Komplexbildung in [%] gegen die Konzentrationen von m-AMSA in linearer Skalierung aufgetragen; **b:** Novobiocin Konzentrationsreihe; **c:** wie (a) und (b) jedoch Inhibitor-Konzentrationen in logarithmischer Skalierung aufgetragen, ■ m-AMSA, ● Novobiocin; Reaktionsbedingungen und Berechnung der Komplexanteile wie in Abb. 46

Konzentrationsreihen zur Berechnung der IC_{50} Werte

Um die unterschiedliche Wirkung der beiden Inhibitoren eingehender zu untersuchen, wurden jeweils verschiedene Konzentrationen getestet (Abb. 47). Über die Konzentrationsabhängigkeit kann die inhibitorische Wirkung verschiedener Substanzen besser verglichen werden. Novobiocin wurde hier über einen sehr weiten Konzentrationsbereich von 100 nM bis 1 mM variiert. Bei der oberen Konzentration wurden bereits fast keine Komplexe mehr registriert (s.o.). Diese Substanz steht in Konkurrenz mit ATP, welches im Ansatz in einer Konzentration 500 μ M vorhanden war. *m*-AMSA wurde in Konzentrationen von 0,5 bis 12 μ M eingesetzt. Wesentlich höhere Konzentrationen von *m*-AMSA konnten wegen Aggregatbildung nicht verwendet werden.

In Abb. 47 ist deutlich zu erkennen, dass für beide Substanzen eine unterschiedliche Abhängigkeit zwischen der Inhibitorkonzentration und dem Anteil der Komplexe besteht. Aus den Auftragungen kann jeweils auch diejenige Inhibitorkonzentration entnommen werden, die zu 50 % Inhibition führt. Dieser Wert wird als IC_{50} Wert bezeichnet, und ist ein Maß für Inhibitorstärke – je niedriger IC_{50} , desto potenter inhibiert die Substanz.

Im Fall von *m*-AMSA nähert sich für hohe Inhibitor-Konzentrationen der maximal erreichbare Komplexanteil an einen Wert von 66 % an. Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit in der Literatur beschriebenen Daten [33]. Ohne Inhibitor liegt der Anteil an Intermediaten bei 15 %. Diese Substanz kann wegen der zunehmenden Komplexbildung eindeutig als *Topoisomerase-Gift* klassifiziert werden. Die halbmaximale Inhibition liegt bei 40,5 % vor. Dieser Komplexanteil wird bei einer *m*-AMSA-Konzentration von 1,25 μ M erreicht, was dem IC_{50} Wert für *m*-AMSA entspricht.

Ein antagonistisches Verhalten zeigt Novobiocin. Durch die Abnahme der Komplexbildung wird bestätigt, dass Novobiocin ein *katalytischer Inhibitor* ist. Der Signalbereich für die Berechnung des IC_{50} Wertes liegt hier zwischen 15 % Komplex (kein Inhibitor) und 0 % Komplex (volle Inhibition), weswegen 50 % Inhibition einem Komplexanteil von 7,5 % entsprechen. Der IC_{50} Wert für Novobiocin kann damit aus der Auftragung zu etwa 62 μ M bestimmt werden.

8 Ergebniszusammenfassung, Diskussion und Ausblick

Gegenstand des Projektes A **FLP-Rekombinase** waren grundlegende Arbeiten zur **Veränderung der Substratspezifität** dieses DNA-modifizierenden Enzyms. Wie in der Einleitung des Projektes A dargestellt (S. 57), bieten DNA-Rekombinasen mit neuen, gezielt einstellbaren Spezifitäten ein extrem großes Anwendungspotenzial in der molekularbiologischen und genetischen Forschung sowie in der Gentherapie. Basis für die Experimente zur Adaption von FLP an neue Erkennungssequenzen war die **evolutive Biotechnologie**, welche die natürlichen Prinzipien der Evolution auf biochemische und biotechnologische Prozesse anwendet. Zentraler Punkt innerhalb von Evolutionsexperimenten ist die **Selektion** von veränderten Varianten. Dementsprechend bestand ein Schwerpunkt des FLP-Projektes in der Etablierung eines *in vitro* Systems zur Selektion von FLP-Varianten durch **Genotyp-Phänotyp-Kopplung**. Zweiter Schwerpunkt war die Assay-Entwicklung für eine Selektion durch Screening. Als Einzelmolekül-sensitive Detektionsmethode wurde **Zweifarbigen-FCS** verwendet.

Das Projekt B **Topoisomerase II** beschäftigte sich ebenfalls mit der Assayentwicklung für die Zweifarben-FCS, jedoch vor einem etwas anderen Hintergrund. Wegen der großen pharmakologischen Bedeutung von Topoisomerase-**Inhibitoren** in der Tumorbekämpfung wurde hier der Aufbau eines System zur schnellen Identifizierung und Charakterisierung neuer inhibierender Substanzen realisiert. Die Verfügbarkeit eines solchen Assays ist essentiell wichtig für den Einsatz von Zweifarben-FCS als **Screening**-Methode.

8.1 Assay-Entwicklung für FLP-Rekombinase – Basis für Selektion durch Screening

8.1.1 FLP und Zweifarben-FCS

Die Kreuzkorrelationsanalyse verleiht der Zweifarben-FCS die Fähigkeit, doppelt fluoreszenzmarkierte Moleküle vor einem Hintergrund einfarbig markierter Spezies isoliert zu beobachten. Durch diese Möglichkeit, eine Zusammenlagerung bzw. Trennung zweier unterschiedlicher Label direkt in Lösung zu messen, ergibt sich ein sehr großes Potenzial, molekulare Interaktionen zu studieren.

Zentrale Fragestellungen für den Einsatz von Zweifarben-FCS als Screening-Technologie zur Selektion von FLP waren hier: Ist es möglich, ein auf Kreuzkorrelation basierendes, sensitives Assay für die DNA-Rekombination durch FLP zu realisieren? Wenn ja, wie muss es aussehen, und welche Möglichkeiten der *inter*- und *intramolekularen* Änderung von Farbstoffkombinationen gibt es? Sind solche Konzepte experimentell durchführbar?

Voraussetzung für Messungen durch Zweifarben-FCS ist die Markierung mit zwei spektral unterschiedlichen Fluorophoren. Durch die Positionierung der Farbstoffe an der DNA, also am Substrat der Rekombinationsreaktion, ergeben sich mehrere Vorteile. Zum einen ist das Substrat natürlich dasjenige Molekül, welches im Laufe der Reaktion verändert wird, und Änderungen in Fluorophorkombinationen sind Basis für die Kreuzkorrelationsanalyse. Zum zweiten ist die Markierung der DNA mit geeigneten Fluorophoren sehr leicht durchführbar, da gelabelte Oligonukleotide kommerziell in guter Qualität verfügbar sind. Für die Position der Marker ergeben sich je nachdem, welche Reaktion geplant ist, prinzipiell verschiedene Möglichkeiten (vgl. Tab. 9-11 und Abb. 19, S. 69ff.). Zunächst wurden geeignete Methoden zur Herstellung der verschiedenen Substrate konzipiert (Abb. 20 und 21). Durch Hybridisierung oder PCR konnten Substrate für alle vorgeschlagenen Messprinzipien generiert werden. Die FRT-sites dieser Substrate können sehr einfach durch Verwendung anderer Oligonukleotide ausgetauscht werden. Das für die Messungen benötigte FLP-Protein konnte im Rahmen dieser Arbeit exprimiert und präpariert werden. Die durchgeführte Codon-Optimierung des gesamten FLP-Gens erbrachte die erforderliche Steigerung der Expressionseffizienz in *E.coli*.

Ein weiterer Aspekt, der für die erfolgreiche Umsetzung eines Kreuzkorrelationsassay für FLP berücksichtigt werden muss, ist die in der Literatur beschriebene FLP-Eigenschaft, nach Substratbindung kaum mehr von der DNA zu dissoziieren [35, 116]. Der Verdau mit Proteinase K war hierbei erfolgreich, denn so konnte die zur Detektion erforderliche, unabhängige Diffusion der Rekombinationsprodukte erreicht werden.

Von den vorgestellten Messprinzipien erwies sich besonders der *intramolekulare* Ansatz als gut geeignet für die Messung von FLP katalysierter DNA-Rekombination durch Kreuzkorrelationsanalyse. Die Reaktion ist hervorragend quantifizierbar. Es konnte ein über weite Bereiche linearer Zusammenhang zwischen der FLP-Konzentration und Menge der Produkte gefunden werden (Abb. 22 S. 76). Eine weitere Überprüfung durch die Analyse der Diffusionszeiten τ_D verifizierte die unterschiedlichen Massen der beiden Produkte.

Als Nächstes erfolgte die Etablierung eines Zweifarben-FCS Assays für *intermolekulare* Rekombination, wie sie mit 2.732 bp langen Edukten als Aktivitätstest für die präparierten FLP-Charge gelelektrophoretisch gezeigt werden konnte. Die für die Kreuzkorrelationsanalyse zunächst verwendeten kurzen Substrate (46 und 104 bp) ergaben eine Bindung der FLP an die DNA, aber keine Rekombination. Für längere Substrate (343 bp) konnte die Bildung von Holliday-Strukturen in Abhängigkeit der FLP-Konzentration beobachtet werden (Abb. 24, S. 81). Eine intermolekulare Umsatz fand jedoch auch hier nicht statt. Es ist also für die hier verwendeten nanomolaren Konzentrationen eine Abhängigkeit der intermolekularen Rekombination von der Länge der DNA festzustellen. Es ist

aber davon auszugehen, dass die intermolekulare Reaktion bei Verwendung genügend langer (2.732 bp, s.o.) Substrate auch in der Zweifarben-FCS funktioniert. Für die mit der entwickelten PCR-Methode mögliche Generierung solch langer zweifarbig markierter Substrate ist zu beachten, dass die Fluorophore nicht endständig positioniert sein sollten, wie durch Vorversuche festgestellt werden konnte (Abb. 25, S. 82).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Rahmen dieser Arbeit ein neues *in vitro* Assay zur Messung von FLP-Rekombinationsaktivität erfolgreich aufgebaut werden konnte. Das System basiert auf Zweifarben-FCS und bietet alle damit verbundenen Vorteile wie Sensitivität, geringen Probenverbrauch und Geschwindigkeit. Die Kombination dieser FCS-Methode mit dem hier entwickelten Assay kann somit als Basis für die Selektion veränderter FLP-Varianten zum Ziel der Veränderung der Substratspezifität angesehen werden.

8.1.2 FLP und FRET

Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) kann zur Bestimmung von Abständen zweier Fluorophore benutzt werden. Hier wurde untersucht, in wieweit dadurch die Messung von DNA-Rekombination erfolgen kann. Folgende wichtige Punkte sind dabei zu klären: Welches Donor-Akzeptor-Paar ist geeignet, und wo sollten die Farbstoffe positioniert werden? Beeinflusst die Anwesenheit der Fluorophore die Reaktion?

Als Donor-Akzeptor-Paar sind Tetramethylrhodamin (TAMRA) und *Cy5* gut geeignet, da eine gute spektrale Überlappung gewährleistet ist. Auch die Markierung der DNA-Substrate ist unproblematisch. Für die Positionierung der Marker innerhalb der FRT-site wurde hier die core-Region ausgewählt welche nicht von FLP bedeckt wird [41]. Damit hat diese Stelle einen wesentlichen Vorteil gegenüber einer Modifizierung innerhalb der FLP-Bindungsregion (13 bp inverted repeats, Abb. 10a), die mit Sicherheit die Reaktion behindern würde. Eine Markierung außerhalb der FLP-Bindungsstellen kommt ebenfalls nicht in Frage, da dabei die Abstände zu groß für FRET-Messungen wären.

Das Edukt für *intramolekulare* Rekombination konnte durch PCR hergestellt werden und führt sowohl bei der Entstehung von Holliday-Strukturen, als auch im Produkt zu einem starken Energietransfer durch die Annäherung der Fluorophore (Abb. 26, S. 84). Im Experiment konnte der Anstieg des Energietransfers in Abhängigkeit der FLP-Konzentration gut beobachtet werden (Abb. 27, S. 86). Dieser Effekt beruhte allein auf der Ausbildung von FLP-DNA-Komplexen (Holliday-Strukturen), die Bildung von Rekombinationsprodukten fand nicht statt, wie durch Proteinase K Verdau gezeigt werden konnte.

Damit lässt sich zusammenfassen, dass FRET zur Messung von FLP-katalysierter Rekombination nur bedingt geeignet ist. Die Beobachtung von Holliday-Strukturen ist sehr gut möglich, jedoch scheinen die Fluorophore die Rekombination sterisch zu behindern.

Da es hier prinzipiell keine bessere Positionierungsmöglichkeit gibt, bietet Zweifarben-FCS gegenüber FRET deutliche Vorteile. Für Kreuzkorrelation kann der Abstand der Fluorophore deutlich größer sein und damit so gewählt werden, dass diese nicht stören.

8.2 FLP in Emulsionen: Selektion durch Genotyp-Phänotyp-Kopplung

Der erste Teil des FLP-Projektes beschäftigte sich mit Assayentwicklung für eine FLP-Selektion durch Screening. Im hier beschriebenen zweiten Teil ging es um den Aufbau eines evolutiven Prozesses zur Veränderung von FLP, welcher die Selektion durch Genotyp-Phänotyp-Kopplung beinhaltet (Abb. 28, S. 89). Die einzelnen Komponenten *Kompartimentierung*, *Expression* und *Selektion* wurden zunächst getrennt entwickelt und getestet, bevor das Gesamtsystem überprüft wurde.

8.2.1 Kompartimentierung: Emulsionen

Für Evolutionsexperimente, muss die eindeutige Zuordnung von Funktion und Information durch räumliche Trennung gewährleistet werden. Das in dieser Arbeit eingesetzte Kompartimentierungskonzept beruht auf Wasser-in-Öl-Emulsionen, in denen die Öl-Phase eine Barriere zwischen den einzelnen wässrigen Reaktionsräumen darstellt. Als zwei Hauptkriterien sind einerseits die Größenverteilung der Tröpfchen und andererseits die biokompatible Herstellungsmethode zu beurteilen.

Die Experimente umfassten zwei unterschiedliche Emulsionssysteme (Tab. 14, S. 92). Mit dem Mineralöl-System konnte eine mittlere Tröpfchen-Größe von 2 μm bei ausreichend schmaler Größenverteilung erreicht werden (Abb. 32, S. 95). Die Extraktion von eingebrachter DNA war ohne Verluste oder Degradierung möglich (Abb. 34, S. 97). Hingegen erbrachte eine Emulgation durch Ultraschall im Isoparaffin-System eine Fragmentierung von DNA mit sich, was die Einsatzmöglichkeiten dieses Systems für evolutive Zwecke stark verringert.

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass die Kompartimentierung durch Wasser-in-Öl-Emulsionen als wichtige Technik für zellfreie Selektionsstrategien gilt. Mit dem Mineralöl-System konnte dazu eine verlässliche Methode etabliert werden.

8.2.2 Expression: *in vitro* Translation

Die zellfreie Translation ist der Schlüssel für die *in vitro* Selektion von Proteinen. Durch Präparation eines Ribosomenextraktes aus *E.coli* konnte hier in Kombination mit T7-RNA-Polymerase und dem entsprechenden Promotor ein aktives System zur gekoppelten

in vitro Transkription/Translations gewonnen werden. Zur Bestimmung der Transkriptionseffizienz wurde ein *molecular beacon* eingesetzt (Abb. 35, S. 98). Damit konnte die Bildung von mRNA sowohl in Lösung, als auch in Emulsionen beobachtet werden.

Die Quantifizierung der gesamten Expressionseffizienz des System erfolgte über das grün-fluoreszierende Protein (GFP). Damit konnte gezeigt werden, dass bei PCR-Produkten als lineare Templates – und um die geht es in diesem System – etwa acht Proteinmoleküle pro DNA-Molekül gebildet werden. Bei der Übertragung dieses Wertes für die FLP-Expression kann davon ausgegangen werden, dass die codon-Optimierung und der bessere Nuklease-Schutz des linearen FLP-Templates durch Phosphorothioate die niedrige Expressionstemperatur von 30 °C kompensieren. Insgesamt ist die Effizienz für *in vitro* Evolutionsexperimente als vollkommen ausreichend zu bewerten, da ohnehin nur wenige Proteinmoleküle pro Kompartiment benötigt werden.

Ein besonders wichtiger Punkt ist die Biokompatibilität von Emulsion und *in vitro*-Expression. Es konnte sowohl fluorimetrisch als auch durch bildgebende Verfahren gezeigt werden, dass die zellfreie Translation in den Kompartimenten der Emulsion möglich ist und ausreichende Effizienz besitzt.

8.2.3 Selektion/Amplifikation: Genotyp-Phänotyp-Kopplung

Die hier entwickelte Selektionsstrategie für die Unterscheidung von – für eine gegebene FRT-site – aktiven von inaktiven FLP-Varianten beruht auf Genotyp-Phänotyp-Kopplung (Abb. 29, S. 90). So entstehen nur in Kompartimenten mit aktiven FLP-Molekülen zirkuläre Rekombinationsprodukte, die für die Amplifikation durch PCR dienen. Zu bewerten ist hierbei, ob die Detektions-PCR ausreichend sensitiv ist und keine falsch-positiven Ergebnisse liefert.

Die erste experimentelle Überprüfung dieses Konzeptes wurde durch Zugabe von FLP-Protein vorgenommen. Bei einer Konzentration von 400 pM fand die intramolekulare Reaktion statt, und die zirkulären Rekombinationsprodukte konnten erfolgreich amplifiziert werden. Eine Verdünnungsreihe ergab Sensitivitäten, wie sie für PCR-Reaktionen üblich sind (Abb. 40, S. 103). Nur zirkularisierte DNA wurde tatsächlich verstärkt, lineares Edukt ergab kein PCR-Produkt. Damit konnten keine falsch-positiven Ergebnisse registriert werden.

8.2.4 Das Gesamtsystem

Nachdem mit dem S30-Extrakt und der Wasser-in-Öl Emulsion verlässliche Systeme zur zellfreien Translation und Kompartimentierung zur Verfügung standen, wurde das Experiment als Gesamtsystem mit *in vitro* exprimiertem FLP wiederholt. Durch Einsatz von FLP-Y343S als „negative Variante“ und wtFLP als „positive Variante“ konnte eine Unterscheidung sowohl in Lösung, als auch in Emulsion nachgewiesen werden (Abb. 41,

S. 104). Selbst die niedrige Template-Konzentration von 400 pM reichte aus, um genügend FLP für die Rekombination zu erzeugen. Es ist also sicher gestellt, dass das System mit einem Template pro Kompartiment auskommt.

Es ist festzuhalten, dass sich die einzelnen Komponenten zu einem funktionierenden Komplettsystem ergänzen, welches ausreichende Expressionseffizienz und Detektionssensitivität aufweist. Damit ergibt sich ein durchgängiger *in vitro* Prozess, der eine wesentliche Basis für die Veränderung der FLP-Rekombinase darstellt.

8.3 Topoisomerase II: Etablierung eines Zweifarben-FCS Assays zur Entdeckung und Klassifizierung neuer Inhibitoren

Innerhalb dieser Arbeit wurde die Entwicklung eines Zweifarben-FCS basierenden Assays zur Auffindung von neuen Topoisomerase II Inhibitoren erfolgreich abgeschlossen. Topoisomerase II stellt ein zentrales Ziel für die Therapie von Tumoren dar [117]. Es ist daher von besonderer Wichtigkeit, neue Substanzen identifizieren zu können, die für eine bessere Behandlung von Krebs verwendet werden können. Mit dem hier aufgebauten System unter Einsatz der Zweifarben-FCS ist ein Schritt in diese Richtung gelungen.

Das entwickelte Assay macht sich einen im katalytischen Zyklus durch die Topoisomerase II intermediär eingeführten Doppelstrangbruch zunutze, der nach Proteinase K Verdau der Topoisomerase zu einer Trennung der unterschiedlichen, an der DNA sitzenden Fluorophore führt. Je nach Inhibitor werden Strangbrüche vermieden oder akkumuliert. Auf diese Weise kann die Art des Inhibitors über die zu oder abnehmende Kreuzkorrelationsamplitude $G(0)$ bestimmt werden. Mit dem bekannten *katalytischen Inhibitor* Novobiocin und dem *Topoisomerase-Gift* *m*-AMSA konnte das Prinzip dieses System experimentell belegt werden (Abb. 46, S. 112). Ohne Inhibitor lagen etwa 15 % Komplexe vor. Dieser Anteil stieg auf über 65 % unter Anwesenheit von *m*-AMSA. Novobiocin hingegen führte zu einer Absenkung auf Null.

Die dann vorgenommene Untersuchung zur Konzentrationsabhängigkeit zeigt, dass das Assay nicht nur qualitativ die beiden Inhibitorklassen zu unterscheiden vermag. Auch die Quantifizierung und Bestimmung der IC_{50} Werte der einzelnen Topoisomerase II Inhibitoren ist ohne weiteres durchführbar (Abb. 47, S. 114).

8.4 Ausblick

Die im Rahmen des FLP-Projektes durchgeführten Experimente zur *Assayentwicklung* (erster Teil des Projektes) für die Zweifarben-FCS sind weitestgehend abgeschlossen. Mit diesem Assay können nun Auswirkungen von Mutationen im FLP-Protein bzw. in der

FRT-site studiert und untereinander verglichen werden. Das im zweiten Teil des Projektes aufgebaute *in vitro Selektionssystem* konnte in seinen Prinzipien experimentell bestätigt werden. Nach einigen weiteren Experimenten zur Charakterisierung der Selektionsleistung (vgl. Abschnitt 6.6.5, S. 105) steht dieses System zur Verfügung, um die FLP-Rekombinase evolutiv auf eine andere Erkennungssequenz (FRT-site) hin zu trimmen. Die Vorgehensweise dazu wird eine schrittweise Veränderung der FRT-site über mehrere evolutive Runden beinhalten.

Das hier für die FLP-Rekombinase konzipierte System ist durch den modularen Aufbau leicht auch auf die evolutive Veränderung anderer site-spezifischer Rekombinasen übertragbar. Dazu wären im Prinzip nur einige Oligonukleotide auszutauschen. Dies gilt sowohl für das Zweifarben-FCS Assay als auch für das Gesamtsystem zur *in vitro* Selektion.

Die Entwicklung des Topoisomerase II Inhibitionsassays wurde erfolgreich abgeschlossen. Weiterführende Experimente zur Ermittlung der Mindest-Inkubationszeiten und damit Reduktion von Messzeiten sind möglich. Im nächsten Schritt kann dieses System zur Identifizierung neuer Inhibitoren dienen. Eine Bibliothek von möglichen Substanzen, wie sie z.B. durch kombinatorische Chemie erzeugt werden können, ist Voraussetzung für diesen Schritt. Die hier verwendete Topoisomerase II aus T4 Phagen gilt als Modell für Typ II DNA Topoisomerasen aus Säugetierorganismen [65, 66]. Damit besteht auch hier eine Übertragbarkeit auf andere Enzyme, und das entwickelte System sollte ohne Schwierigkeiten mit humanen Topoisomerasen durchführbar sein.

Literaturverzeichnis

- [1] M. D. Adams, S. E. Celniker, R. A. Holt, C. A. Evans, J. D. Gocayne, P. G. Amanatides, S. E. Scherer, P. W. Li, R. A. Hoskins, R. F. Galle, R. A. George, S. E. Lewis, S. Richards, M. Ashburner, S. N. Henderson, G. G. Sutton, J. R. Wortman, M. D. Yandell, Q. Zhang, L. X. Chen, R. C. Brandon, Y. H. C. Rogers, R. G. Blazej, M. Champe, and B. D. Pfeiffer, *The genome sequence of drosophila melanogaster [review]*, Science **287** (2000), no. 5461, 2185–2195.
- [2] T. Andoh and R. Ishida, *Catalytic inhibitors of DNA topoisomerase II [review]*, Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure & Expression **1400** (1998), no. 1-3, 155–171.
- [3] D. Babineau, D. Vetter, B. J. Andrews, R. M. Gronostajski, G. A. Proteau, L. G. Beatty, and P. D. Sadowski, *The FLP protein of the 2-micron plasmid of yeast. Purification of the protein from Escherichia coli cells expressing the cloned FLP gene*, J. Biol. Chem. **260** (1985), no. 22, 12313–12319.
- [4] K. Bacia, *Ultrasensitive dynamische Analyse der molekularen Mikroumgebung in der lebenden Zelle*, Diplomarbeit, Universität Hannover, 2001.
- [5] K. Bacia and P. Schwille, *A dynamic view of cellular processes by in vivo fluorescence auto- and cross-correlation spectroscopy*, Methods **29** (2003), no. 1, 74–85.
- [6] K. Bacia, I. V. Majoul and P. Schwille, *Probing the endocytic pathway in live cells using dual-color fluorescence cross-correlation analysis*, Biophys. J. **83** (2002), no. 2, 1184–1193.
- [7] N. Barnabe and B. B. Hasinoff, *High-throughput fluorescence flow-injection topoisomerase II inhibition assay*, J. of Chromatography B **760** (2001), no. 2, 263–269.
- [8] J. M. Berger, *Structure of DNA topoisomerases [review]*, Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure & Expression **1400** (1998), no. 1-3, 3–18.

LITERATURVERZEICHNIS

- [9] J. M. Berger, D. Fass, J. C. Wang, and S. C. Harrison, *Structural similarities between topoisomerases that cleave one or both DNA strands*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95** (1998), no. 14, 7876–7881.
- [10] J. M. Berger, S. J. Gamblin, S. C. Harrison, and J. C. Wang, *Structure and mechanism of DNA topoisomerase II*, Nature **379** (1996), no. 6562, 225–232.
- [11] J. M. Berger and J. C. Wang, *Recent developments in DNA topoisomerase II structure and mechanism*, Curr. Opin. Struct. Biol. **6** (1996), no. 1, 84–90.
- [12] J. Bieschke and P. Schwille, *Aggregation of prion protein investigated by dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy*, Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes **2** (1998), 81–86.
- [13] F. R. Blattner, G. Plunkett, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Colladovides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao, *The complete genome sequence of Escherichia coli K-12 [review]*, Science **277** (1997), no. 5331, 1453.
- [14] R. R. Breaker and G. F. Joyce, *A DNA enzyme that cleaves RNA*, Curr. Biol. **1** (1994), 223–229.
- [15] F. Buchholz, P. O. Angrand, and A. F. Stewart, *Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis*, Nat. Biotechnol. **16** (1998), no. 7, 657–662.
- [16] D. A. Burden and N. Osheroff, *Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme [review]*, Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure & Expression **1400** (1998), no. 1-3, 139–154.
- [17] R. C. Cadwell and G. F. Joyce, *Randomization of genes by PCR mutagenesis*, PCR Methods Appl. **2** (1992), no. 1, 28–33.
- [18] Y. Chen, U. Narendra, L. E. Iype, M. M. Cox, and P. A. Rice, *Crystal structure of a FLP recombinase-holliday junction complex: assembly of an active oligomer by helix swapping*, Mol. Cell **6** (2000), no. 4, 885–897.
- [19] S. N. Cohen, A. C. Chang, H. W. Boyer, and R. B. Helling, *Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **70** (1973), no. 11, 3240–3244.
- [20] M. J. Corey and E. Corey, *On the failure of de novo-designed peptides as biocatalysts. [review]*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93** (1996), no. 21, 11428–11434.

- [21] C. Darwin, *On the origin of species*, Harvard University Press, 1964.
- [22] A. A. Deniz, M. Dahan, J. R. Grunwell, T. J. Ha, A. E. Faulhaber, D. S. Chemla, S. Weiss, and P. G. Schultz, *Single-pair fluorescence resonance energy transfer on freely diffusing molecules: observation of forster distance dependence and subpopulations*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96** (1999), no. 7, 3670–3675.
- [23] A. A. Deniz, T. A. Laurence, G. S. Beligere, M. Dahan, A. B. Martin, D. S. Chemla, P. E. Dawson, P. G. Schultz, and S. Weiss, *Single-molecule protein folding: diffusion fluorescence resonance energy transfer studies of the denaturation of chymotrypsin inhibitor 2*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97** (2000), no. 10, 5179–5184.
- [24] P. Dittrich, F. Malvezzi-Campeggi, M. Jahnz, and P. Schwille, *Accessing molecular dynamics in cells by fluorescence correlation spectroscopy*, Biol. Chem. **382** (2001), no. 3, 491–494.
- [25] P. S. Dittrich and P. Schwille, *Spatial two-photon fluorescence cross-correlation spectroscopy for controlling molecular transport in microfluidic structures*, Anal. Chem. **74** (2002), no. 17, 4472–4479.
- [26] T. Dobzhansky, *Nothing in biology makes sense except in the light of evolution*, Am. Bio. Teacher **35** (1973), 125–129.
- [27] M. Eigen, *Natural selection: a phase transition?*, Biophys. Chem. **85** (2000), no. 2-3, 101–123.
- [28] M. Eigen, J. McCaskill, and P. Schuster, *Molecular quasi-species*, Journal of Physical Chemistry **92** (1988), 6881–6891.
- [29] M. Eigen and R. Rigler, *Sorting single molecules: application to diagnostics and evolutionary biotechnology. [review]*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91** (1994), no. 13, 5740–5747.
- [30] A. D. Ellington, *Experimental testing of theories of an early RNA world*, Methods Enzymol. **224** (1993), 646–664.
- [31] E. L. Elson and D. Magde, *Fluorescence correlation spectroscopy. I. conceptual basis and theory*, Biopolymers **13** (1974), no. 1, 1–27.
- [32] T. Forster, *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*, Annalen der Physik **6** (1948), no. 2, 55–75.

LITERATURVERZEICHNIS

- [33] C. H. Freudenreich and K. N. Kreuzer, *Localization of an aminoacridine antitumor agent in a type II topoisomerase-DNA complex*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91** (1994), no. 23, 11007–11011.
- [34] A. Furka, *History of combinatorial chemistry [review]*, Drug Dev. Res. **36** (1995), no. 1, 1–12.
- [35] C. A. Gates and M. M. Cox, *Flp recombinase is an enzyme*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85** (1988), no. 13, 4628–4632.
- [36] M. Gellert, M. H. O’Dea, T. Itoh, and J. Tomizawa, *Novobiocin and coumermycin inhibit DNA supercoiling catalyzed by DNA gyrase*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **73** (1976), no. 12, 4474–4478.
- [37] A. Gibbons, *Biotech’s second generation*, Science **256** (1992), 766–768.
- [38] W. Gilbert, *Origin of life: The RNA world*, Nature **319** (1986), 618–618.
- [39] J. M. Gottesfeld, *Novobiocin inhibits RNA polymerase III transcription in vitro by a mechanism distinct from DNA topoisomerase II*, Nucleic Acids Res. **14** (1986), no. 5, 2075–2088.
- [40] A. D. Griffiths and D. S. Tawfik, *Man-made enzymes – from design to in vitro compartmentalisation*, Curr. Opin. Biotechnol. **11** (2000), no. 4, 338–353.
- [41] R. M. Gronostajski and P. D. Sadowski, *Determination of DNA sequences essential for FLP-mediated recombination by a novel method*, J. Biol. Chem. **260** (1985), no. 22, 12320–12327.
- [42] R. M. Gronostajski and P. D. Sadowski, *The FLP protein of the 2-micron plasmid of yeast. inter- and intramolecular reactions*, J. Biol. Chem. **260** (1985), no. 22, 12328–12335.
- [43] T. R. Hammonds, A. Maxwell, and J. R. Jenkins, *Use of a rapid throughput in vivo screen to investigate inhibitors of eukaryotic topoisomerase II enzymes*, Antimicrobial Agents & Chemotherapy **42** (1998), no. 4, 889–894.
- [44] K. R. Hande, *Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II [review]*, Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure & Expression **1400** (1998), no. 1-3, 173–184.
- [45] J. Hanes and A. Pluckthun, *In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94** (1997), no. 10, 4937–4942.

- [46] E. Haustein and P. Schwille, *Ultrasensitive investigations of biological systems by fluorescence correlation spectroscopy*, *Methods* **29** (2003), 153–166.
- [47] K. G. Heinze, A. Koltermann, and P. Schwille, *Simultaneous two-photon excitation of distinct labels for dual-color fluorescence cross-correlation analysis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** (2000), no. 19, 10377–10382.
- [48] K. G. Heinze, M. Rarbach, M. Jahnz, and P. Schwille, *Two-photon fluorescence coincidence analysis: Rapid measurements of enzyme kinetics*, *Biophys. J.* **83** (2002), no. 3, 1671–1681.
- [49] L. E. Iype, *Studies of recombination proteins in homologous and site-specific DNA recombination*, Thesis/dissertation, University of Wisconsin-Madison, 1995.
- [50] D. A. Jackson, R. H. Symons, and P. Berg, *Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69** (1972), no. 10, 2904–2909.
- [51] L. Jaeger, *The new world of ribozymes*, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7** (1997), no. 3, 324–335.
- [52] L. Jermutus, R. Kolly, Z. Foldes-Papp, J. Hanes, R. Rigler, and A. Pluckthun, *Ligand binding of a ribosome-displayed protein detected in solution at the single molecule level by fluorescence correlation spectroscopy*, *Eur. Biophys. J.* **31** (2002), no. 3, 179–184.
- [53] L. Jermutus, L. A. Ryabova, and A. Pluckthun, *Recent advances in producing and selecting functional proteins by using cell-free translation*, *Curr. Opin. Biotechnol.* **9** (1998), no. 5, 534–548.
- [54] J. F. Kane, *Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in Escherichia coli. [review]*, *Curr. Opin. Biotechnol.* **6** (1995), no. 5, 494–500.
- [55] S. H. Kaufmann, *Cell death induced by topoisomerase-targeted drugs - more questions than answers [review]*, *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure & Expression* **1400** (1998), no. 1-3, 195–211.
- [56] E. Keinan and R. A. Lerner, *The first decade of antibody catalysis - perspective and prospects*, *Isr. J. Chem.* **36** (1996), no. 2, 113–119.
- [57] U. Kellner, M. Sehested, P. B. Jensen, F. Gieseler, and P. Rudolph, *Culprit and victim – DNA topoisomerase II. [review]*, *Lancet Oncology* **3** (2002), no. 4, 235–243.

LITERATURVERZEICHNIS

- [58] U. Kettling, A. Koltermann, and M. Eigen, *Evolutionary biotechnology - reflections and perspectives*, Curr. Top. Microbiol. Immunol. **243** (1999), 173–185.
- [59] U. Kettling, A. Koltermann, P. Schwille, and M. Eigen, *Real-time enzyme kinetics monitored by dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95** (1998), 1416–1420.
- [60] I. M. Khan and J. M. Coulson, *A novel method to stabilise antisense oligonucleotides against exonuclease degradation*, Nucleic Acids Res. **21** (1993), no. 12, 2957–2958.
- [61] N. K. Kochetkov, *Catalytic antibodies as a new-generation of biocatalysts [review]*, Russian Chemical Bulletin **46** (1997), no. 9, 1495–1500.
- [62] A. Koltermann and U. Kettling, *Principles and methods of evolutionary biotechnology [review]*, Biophys. Chem. **66** (1997), no. 2-3, 159–177.
- [63] A. Koltermann, U. Kettling, J. Bieschke, T. Winkler, and M. Eigen, *Rapid assay processing by integration of dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy: High throughput screening for enzyme activity.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95** (1998), 1421–1426.
- [64] A. Koltermann, U. Kettling, J. Stephan, T. Winkler, and M. Eigen, *Dual-color confocal fluorescence spectroscopy and its application in biotechnology*, Fluorescence Correlation Spectroscopy - Theory and Application (R. Rigler and E. Elson, eds.), Springer-Verlag, 2000.
- [65] K. N. Kreuzer, *A bacteriophage model system for studying topoisomerase inhibitors. [review]*, Adv. Pharmacol. **29B** (1994), 171–186.
- [66] K. N. Kreuzer, *Bacteriophage T4, a model system for understanding the mechanism of type II topoisomerase inhibitors [review]*, Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure & Expression **1400** (1998), no. 1-3, 339–347.
- [67] S. A. Lesley, *Preparation and use of E.coli S-30 extracts*, Methods Mol. Biol. **37** (1995), 265–278.
- [68] D. W. Leung, E. Chen, and D. V. Goeddel, *A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction.*, Technique **1** (1989), no. 1, 11–15.
- [69] D. Magde, E. L. Elson, and W. W. Webb, *Thermodynamic fluctuations in a reacting system - measurement by fluorescence correlation spectroscopy*, Phys. Rev. Lett. **29** (1972), 705–708.

- [70] D. Magde, E. L. Elson, and W. W. Webb, *Fluorescence correlation spectroscopy. II. an experimental realization*, Biopolymers **13** (1974), no. 1, 29–61.
- [71] T. Matsuura, A. Ernst, and A. Pluckthun, *Construction and characterization of protein libraries composed of secondary structure modules*, Protein Sci. **11** (2002), no. 11, 2631–2643.
- [72] L. Meyer-Leon, C. A. Gates, J. M. Attwood, E. A. Wood, and M. M. Cox, *Purification of the FLP site-specific recombinase by affinity chromatography and re-examination of basic properties of the system*, Nucleic Acids Res. **15** (1987), no. 16, 6469–6488.
- [73] L. Meyer-Leon, J. F. Senecoff, R. C. Bruckner, and M. M. Cox, *Site-specific genetic recombination promoted by the FLP protein of the yeast 2-micron plasmid in vitro*, Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol. **49** (1984), 797–804.
- [74] Y. R. De Miguel, *A diversity of approaches to combinatorial chemistry and biology*, Trends. Biotechnol. **16** (1998), no. 2, 49–50.
- [75] D. R. Mills, R. L. Peterson, and S. Spiegelman, *An extracellular darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **58** (1967), no. 1, 217–224.
- [76] K. Mizuuchi, M. H. O’Dea, and M. Gellert, *DNA gyrase: subunit structure and ATPase activity of the purified enzyme*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75** (1978), no. 12, 5960–5963.
- [77] W. D. S. Motherwell, H. L. Ammon, J. D. Dunitz, A. Dzyabchenko, P. Erk, A. Gavazzotti, D. W. M. Hofmann, F. J. J. Leusen, J. P. M. Lommerse, W. T. M. Mooij, S. L. Price, H. Scheraga, B. Schweizer, M. U. Schmidt, B. P. van Eijck, P. Verwer, and D. E. Williams, *Crystal structure prediction of small organic molecules: a second blind test*, Acta Crystallographica - Section B, Structural Science **58** (2002), no. Part 4, 647–661.
- [78] J. L. Nitiss, *Investigating the biological functions of DNA topoisomerases in eukaryotic cells [review]*, Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure & Expression **1400** (1998), no. 1-3, 63–81.
- [79] F. Oehlenschläger, P. Schwill, and M. Eigen, *Detection of HIV-1 RNA by nucleic acid sequence-based amplification combined with fluorescence correlation spectroscopy*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93** (1996), no. 23, 12811–12816.

LITERATURVERZEICHNIS

- [80] J. Pillardy, C. Czaplewski, A. Liwo, J. Lee, D. R. Ripoll, R. Kazmierkiewicz, S. Oldziej, W. J. Wedemeyer, K. D. Gibson, Y. A. Arnautova, J. Saunders, Y. J. Ye, and H. A. Scheraga, *Recent improvements in prediction of protein structure by global optimization of a potential energy function*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98** (2001), no. 5, 2329–2333.
- [81] A. Pluckthun, *Catalytic antibodies*, Methods of Immunological Analysis (R. F. Masseyeff, W. H. Albert, and N. A. Staines, eds.), vol. 2, VCH-Verlag, 1993, pp. 414–430.
- [82] A. Pluckthun, C. Schaffitzel, J. Hanes, and L. Jermutus, *In vitro selection and evolution of proteins [review]*, ADVANCES IN PROTEIN CHEMISTRY **55** (2001), 367–403.
- [83] D. Posada, K. A. Crandall, and E. C. Holmes, *Recombination in evolutionary genomics [review]*, Annu. Rev. Genet. **36** (2002), 75–97.
- [84] P. V. Prasad, L. J. Young, and M. Jayaram, *Mutations in the 2-microns circle site-specific recombinase that abolish recombination without affecting substrate recognition*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84** (1987), no. 8, 2189–2193.
- [85] G. Proteau, D. Sidenberg, and P. Sadowski, *The minimal duplex DNA sequence required for site-specific recombination promoted by the FLP protein of yeast in vitro*, Nucleic Acids Res. **14** (1986), no. 12, 4787–4802.
- [86] M. Rarbach, U. Kettling, A. Koltermann, and M. Eigen, *Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for monitoring the kinetics of enzyme-catalyzed reactions*, Methods **24** (2001), no. 2, 104–116.
- [87] B. Rauer, E. Neumann, J. Widengren, and R. Rigler, *Fluorescence correlation spectrometry of the interaction kinetics of tetramethylrhodamine alpha-bungarotoxin with torpedo californica acetylcholine receptor*, Biophys. Chem. **58** (1996), no. 1–2, 3–12.
- [88] R. Rigler, Z. Foldesapp, F. J. Meyeralmes, C. Sammet, M. Volcker, and A. Schnetz, *Fluorescence cross-correlation - a new concept for polymerase-chain-reaction*, J. Biotechnol. **63** (1998), no. 2, 97–109.
- [89] R. Rigler, U. Mets, J. Widengren, and P. Kask, *Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background analysis of translational diffusion*, Eur. Biophys. J. **22** (1993), no. 3, 169–175.
- [90] L. Ringrose, V. Lounnas, L. Ehrlich, F. Buchholz, R. Wade, and A. F. Stewart, *Comparative kinetic analysis of FLP and Cre recombinases - mathematical models for DNA binding and recombination*, J. Mol. Biol. **284** (1998), no. 2, 363–384.

- [91] P. D. Sadowski, *The FLP recombinase of the 2-microns plasmid of saccharomyces cerevisiae. [review]*, Progress in Nucleic Acid Research & Molecular Biology **51** (1995), 53–91.
- [92] S. W. Santoro and P. G. Schultz, *Directed evolution of the site specificity of Cre recombinase*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99** (2002), no. 7, 4185–4190.
- [93] L. P. Schacter, C. Anderson, R. M. Canetta, S. Kelley, C. Nicaise, N. Onetto, M. Rozenzweig, L. Smaldone, and B. Winograd, *Drug discovery and development in the pharmaceutical industry. [review]*, Semin. Oncol. **19** (1992), no. 6, 613–621.
- [94] C. Schmidt-Dannert and F. H. Arnold, *Directed evolution of industrial enzymes*, Trends. Biotechnol. **17** (1999), no. 4, 135–136.
- [95] P. Schwille, *Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie: Analyse biochemischer Systeme auf Einzelmolekülebene*, Thesis/dissertation, Technische Universität Braunschweig, 1996.
- [96] P. Schwille, J. Bieschke, and F. Oehlenschläger, *Kinetic investigation by fluorescence correlation spectroscopy - the analytical and diagnostic potential of diffusion studies [review]*, Biophys. Chem. **66** (1997), no. 2-3, 211–228.
- [97] P. Schwille and K. G. Heinze, *Two-photon fluorescence cross-correlation spectroscopy*, Chemphyschem **2** (2001), no. 5, 269–272.
- [98] P. Schwille, J. Koriach, and W. W. Webb, *Fluorescence correlation spectroscopy with single-molecule sensitivity on cell and model membranes*, Cytometry **36** (1999), 176–182.
- [99] P. Schwille, F. J. Meyeralmes, and R. Rigler, *Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution*, Biophys. J. **72** (1997), no. 4, 1878–1886.
- [100] P. R. Selvin, *Fluorescence resonance energy transfer*, Methods Enzymol. **246** (2002), 300–334.
- [101] J. F. Senecoff and M. M. Cox, *Directionality in FLP protein-promoted site-specific recombination is mediated by DNA-DNA pairing*, J. Biol. Chem. **261** (1986), no. 16, 7380–7386.
- [102] M. L. Shibuya, W. E. Buddenbaum, A. L. Don, H. Utsumi, D. Suci, T. Kosaka, and M. M. Elkind, *Amsacrine-induced lesions in DNA and their modulation by novobiocin and 2,4-dinitrophenol*, Cancer Res. **51** (1991), no. 2, 573–580.

LITERATURVERZEICHNIS

- [103] Y. Shimizu, A. Inoue, Y. Tomari, T. Suzuki, T. Yokogawa, K. Nishikawa, and T. Ueda, *Cell-free translation reconstituted with purified components*, Nat. Biotechnol. **19** (2001), no. 8, 751–755.
- [104] W. P. C. Stemmer, A. Cramer, K. D. Ha, T. M. Brennan, and H. L. Heyneker, *Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides*, Gene **164** (1995), no. 1, 49–53.
- [105] A. Sugino, N. P. Higgins, P. O. Brown, C. L. Peebles, and N. R. Cozzarelli, *Energy coupling in DNA gyrase and the mechanism of action of novobiocin*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75** (1978), no. 10, 4838–4842.
- [106] D. S. Tawfik and A. D. Griffiths, *Man-made cell-like compartments for molecular evolution*, Nat. Biotechnol. **16** (1998), no. 7, 652–656.
- [107] Z. Topcu, *DNA topoisomerases as targets for anticancer drugs [review]*, Journal of Clinical Pharmacy & Therapeutics **26** (2001), no. 6, 405–416.
- [108] A. Tramontano, K. D. Janda, and R. A. Lerner, *Catalytic antibodies*, Science **234** (1986), no. 4783, 1566–1570.
- [109] R. P. Tripathi, S. K. Rastogi, B. Kundu, J. K. Saxena, V. J. M. Reddy, S. Srivastava, S. Chandra, and A. P. Bhanduri, *Identification of inhibitors of DNA topoisomerase II from a synthetic library of glycoconjugates [review]*, Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening **4** (2001), no. 3, 237–244.
- [110] S. Tyagi and F. R. Kramer, *Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization*, Nat. Biotechnol. **14** (1996), no. 3, 303–308.
- [111] E. Uhlmann, A. Rytte, and A. Peyman, *Studies on the mechanism of stabilization of partially phosphorothioated oligonucleotides against nucleolytic degradation*, Antisense Nucleic Acid Drug Dev. **7** (1997), no. 4, 345–350.
- [112] H. Utsumi, M. L. Shibuya, T. Kosaka, W. E. Buddenbaum, and M. M. Elkind, *Abrogation by novobiocin of cytotoxicity due to the topoisomerase II inhibitor amsacrine in chinese hamster cells*, Cancer Res. **50** (1990), no. 9, 2577–2581.
- [113] Bosch M. van den, P. H. M. Lohman, and A. Pastink, *DNA double-strand break repair by homologous recombination [review]*, Biol. Chem. **383** (2002), no. 6, 873–892.
- [114] J. C. Venter and many others, *The sequence of the human genome*, Science **291** (2001), no. 5507, 1304–1351.

- [115] Y. Voziyanov, J. H. Konieczka, A. F. Stewart, and M. Jayaram, *Stepwise manipulation of DNA specificity in FLP recombinase: Progressively adapting FLP to individual and combinatorial mutations in its target site*, J. Mol. Biol. **326** (2003), no. 1, 65–76.
- [116] L. L. Waite and M. M. Cox, *A protein dissociation step limits turnover in FLP recombinase-mediated site-specific recombination*, J. Biol. Chem. **270** (1995), no. 40, 23409–23414.
- [117] J. V. Walker and J. L. Nitiss, *DNA topoisomerase II as a target for cancer chemotherapy [review]*, Cancer Investigation **20** (2002), no. 4, 570–589.
- [118] J. C. Wang, *DNA topoisomerases [review]*, Annu. Rev. Biochem. **65** (1996), 635–692.
- [119] J. C. Wang, *Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase - the story of a simple molecular machine [review]*, Quart. Rev. Biophys. **31** (1998), no. 2, 107–144.
- [120] R. H. Waterston, K. Lindblad-Toh, E. Birney, J. Rogers, J. F. Abril, P. Agarwal, R. Agarwala, R. Ainscough, M. Alexandersson, P. An, S. E. Antonarakis, J. Attwood, R. Baertsch, J. Bailey, K. Barlow, S. Beck, E. Berry, B. Birren, T. Bloom, P. Bork, M. Botcherby, N. Bray, M. R. Brent, D. G. Brown, and S. D. Brown, *Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome [review]*, Nature **420** (2002), no. 6915, 520–562.
- [121] R. Winkler and H. Winkler, *Die Untersuchung schneller chemischer Reaktionen in Lösung mit Hilfe von Relaxationsverfahren*, Allgemeine und praktische Chemie **17** (1966), 599.
- [122] T. Winkler, U. Kettling, A. Koltermann, and M. Eigen, *Confocal fluorescence coincidence analysis: an approach to ultra high-throughput screening*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96** (1999), no. 4, 1375–1378.
- [123] E. W. Zerbst, *Bionik - Biologische Funktionsprinzipien und ihre technischen Anwendungen*, Teubner Studienbücher der Biologie, Stuttgart, 1987.

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
APD	avalanche-photo-diode
BSA	Rinderserumalbumin
CCD	charged-coupled-devices
cP	centi-Poise; $1 \text{ cP} = 10^{-3} \frac{\text{kg}}{\text{m}\cdot\text{s}}$
CPG	controlled-pore-glass
FLP	“flip“ Rekombinase aus Hefe
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FRT	FLP-recognition-target
HFT	Hauptfarbteiler (Dichroit)
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
NFT	Nebenfarbteiler (Dichroit)
Nonidet P-40	non-ionic-detergent
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PB/E-PEO	Poly-butylen/ethylen-Polyethylenoxyd-Block-Copolymer
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSI	pounds per square inch; $1 \text{ psi} = 6894,757 \text{ Pascal} (\frac{\text{kg}}{\text{m}\cdot\text{s}^2})$
RG	rhodamine green
RPM	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
Tween80	Polyoxyethylenesorbitan-Monooleate
wt	Wildtyp

Sequenzen

Alle DNA-Sequenzen sind in 5' → 3' Richtung angegeben.

codon-optimierte Sequenz der FLP-Rekombinase

```
0001 ATG CCG CAG TTC GAC ATC CTG TGC AAA ACC CCG CCG AAA GTT 0042
0001 Met Pro Gln Phe Asp Ile Leu Cys Lys Thr Pro Pro Lys Val 0014

0043 CTG GTT CGT CAG TTC GTT GAA CGT TTC GAA CGT CCG TCC GGT 0084
0015 Leu Val Arg Gln Phe Val Glu Arg Phe Glu Arg Pro Ser Gly 0028

0085 GAA AAA ATC GCT CTG TGC GCT GCT GAA CTG ACC TAC CTG TGC 0126
0029 Glu Lys Ile Ala Leu Cys Ala Ala Glu Leu Thr Tyr Leu Cys 0042

0127 TGG ATG ATC ACC CAC AAC GGT ACC GCT ATC AAA CGT GCT ACC 0168
0043 Trp Met Ile Thr His Asn Gly Thr Ala Ile Lys Arg Ala Thr 0056

0169 TTC ATG TCC TAC AAC ACC ATC ATC TCC AAC TCC CTG TCC CTG 0210
0057 Phe Met Ser Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Asn Ser Leu Ser Leu 0070

0211 GAC ATC GTT AAC AAA TCC CTG CAG TTC AAA TAC AAA ACC CAG 0252
0071 Asp Ile Val Asn Lys Ser Leu Gln Phe Lys Tyr Lys Thr Gln 0084

0253 AAA GCT ACC ATC CTG GAA GCT TCC CTG AAA AAA CTG ATC CCG 0294
0085 Lys Ala Thr Ile Leu Glu Ala Ser Leu Lys Lys Leu Ile Pro 0098

0295 GCT TGG GAA TTC ACC ATC ATC CCG TAC TAC GGT CAG AAA CAC 0336
0099 Ala Trp Glu Phe Thr Ile Ile Pro Tyr Tyr Gly Gln Lys His 0112

0337 CAG TCC GAC ATC ACC GAC ATC GTT TCC TCC CTG CAG CTG CAG 0378
0113 Gln Ser Asp Ile Thr Asp Ile Val Ser Ser Leu Gln Leu Gln 0126

0379 TTC GAA TCC TCC GAA GAA GCT GAC AAA GGT AAC TCC CAC TCC 0420
0127 Phe Glu Ser Ser Glu Glu Ala Asp Lys Gly Asn Ser His Ser 0140
```


0421 AAA AAA ATG CTG AAA GCT CTG CTG TCC GAA GGT GAA TCC ATC 0462
 0141 Lys Lys Met Leu Lys Ala Leu Leu Ser Glu Gly Glu Ser Ile 0154

 0463 TGG GAA ATC ACC GAA AAA ATC CTG AAC TCC TTC GAA TAC ACC 0504
 0155 Trp Glu Ile Thr Glu Lys Ile Leu Asn Ser Phe Glu Tyr Thr 0168

 0505 TCC CGT TTC ACC AAA ACC AAA ACC CTG TAC CAG TTC CTG TTC 0546
 0169 Ser Arg Phe Thr Lys Thr Lys Thr Leu Tyr Gln Phe Leu Phe 0182

 0547 CTG GCT ACC TTC ATC AAC TGC GGT CGT TTC TCC GAC ATC AAA 0588
 0183 Leu Ala Thr Phe Ile Asn Cys Gly Arg Phe Ser Asp Ile Lys 0196

 0589 AAC GTT GAC CCG AAA TCC TTC AAA CTG GTT CAG AAC AAA TAC 0630
 0197 Asn Val Asp Pro Lys Ser Phe Lys Leu Val Gln Asn Lys Tyr 0210

 0631 CTG GGT GTT ATC ATC CAG TGC CTG GTT ACC GAA ACC AAA ACC 0672
 0211 Leu Gly Val Ile Ile Gln Cys Leu Val Thr Glu Thr Lys Thr 0224

 0673 TCC GTT TCC CGT CAC ATC TAC TTC TTC TCC GCT CGT GGT CGT 0714
 0225 Ser Val Ser Arg His Ile Tyr Phe Phe Ser Ala Arg Gly Arg 0238

 0715 ATC GAC CCG CTG GTT TAC CTG GAC GAA TTC CTG CGT AAC TCC 0756
 0239 Ile Asp Pro Leu Val Tyr Leu Asp Glu Phe Leu Arg Asn Ser 0252

 0757 GAA CCG GTT CTG AAA CGT GTT AAC CGT ACC GGT AAC TCC TCC 0798
 0253 Glu Pro Val Leu Lys Arg Val Asn Arg Thr Gly Asn Ser Ser 0266

 0799 TCC AAC AAA CAG GAA TAC CAG CTG CTG AAA GAC AAC CTG GTT 0840
 0267 Ser Asn Lys Gln Glu Tyr Gln Leu Leu Lys Asp Asn Leu Val 0280

 0841 CGT TCC TAC AAC AAA GCT CTG AAA AAA AAC GCT CCG TAC TCC 0882
 0281 Arg Ser Tyr Asn Lys Ala Leu Lys Lys Asn Ala Pro Tyr Ser 0294

 0883 ATC TTC GCT ATC AAA AAC GGT CCG AAA TCC CAC ATC GGT CGT 0924
 0295 Ile Phe Ala Ile Lys Asn Gly Pro Lys Ser His Ile Gly Arg 0308

 0925 CAC CTG ATG ACC TCC TTC CTG TCC ATG AAA GGT CTG ACC GAA 0966
 0309 His Leu Met Thr Ser Phe Leu Ser Met Lys Gly Leu Thr Glu 0322

0967 CTG ACC AAC GTT GTT GGT AAC TGG TCC GAC AAA CGT GCT TCC 1008
 0323 Leu Thr Asn Val Val Gly Asn Trp Ser Asp Lys Arg Ala Ser 0336

 1009 GCT GTT GCT CGT ACC ACC TAC ACC CAC CAG ATC ACC GCT ATC 1050
 0337 Ala Val Ala Arg Thr Thr Tyr Thr His Gln Ile Thr Ala Ile 0350

 1051 CCG GAC CAC TAC TTC GCT CTG GTT TCC CGT TAC TAC GCT TAC 1092
 0351 Pro Asp His Tyr Phe Ala Leu Val Ser Arg Tyr Tyr Ala Tyr 0364

 1093 GAC CCG ATC TCC AAA GAA ATG ATC GCT CTG AAA GAC GAA ACC 1134
 0365 Asp Pro Ile Ser Lys Glu Met Ile Ala Leu Lys Asp Glu Thr 0378

 1135 AAC CCG ATC GAA GAA TGG CAG CAC ATC GAA CAG CTG AAA GGT 1176
 0379 Asn Pro Ile Glu Glu Trp Gln His Ile Glu Gln Leu Lys Gly 0392

 1177 TCC GCT GAA GGT TCC ATC CGT TAC CCG GCT TGG AAC GGT ATC 1218
 0393 Ser Ala Glu Gly Ser Ile Arg Tyr Pro Ala Trp Asn Gly Ile 0406

 1219 ATC TCC CAG GAA GTT CTG GAC TAC CTG TCC TCC TAC ATC AAC 1260
 0407 Ile Ser Gln Glu Val Leu Asp Tyr Leu Ser Ser Tyr Ile Asn 0420

 1261 CGT CGT ATC TAA 1272
 0421 Arg Arg Ile *** 0424

verwendete Oligonukleotide

up1: CGAACGAGTCTACATATGCCGCAGTTCGACATCCTGTGCAAAAC
 up2: CCCGCCGAAAGTTCTGGTTCGTTCAGTTCGTTGAACGT
 up3: TTCGAACGTCCGTCCGGTGAAAAAATCGCTCTGTGC
 up4: GCTGCTGAACTGACCTACCTGTGCTGGATGATCACCCACA
 up5: ACGGTACCGCTATCAAACGTGCTACCTTCATGTCCTACAACA
 up6: CCATCATCTCCAACCTCCCTGTCCCTGGACATCGTTAACAAT
 up7: CCCTGCAGTTCAAATACAAAACCCAGAAAGCTACCATCCTG
 up8: GAAGCTTCCCTGAAAAAACTGATCCCGGCTTGGAATT
 up9: CACCATCATCCCGTACTACGGTCAGAAACACCAGTCCGACA
 up10: TCACCGACATCGTTTCCTCCCTGCAGCTGCAGTTCG
 up11: AATCTCCGAAGAAGCTGACAAAGGTAACCTCCCACTCCAAA
 up12: AAAATGCTGAAAGCTCTGCTGTCCGAAGGTGAATCCATCT
 up13: GGGAAATCACCGAAAAAATCCTGAACTCCTTCGAATACACCT

up14: CCCGTTTCACCAAAACCAAAACCCTGTACCAGTTCCTGTT
 up15: CCTGGCTACCTTCATCAACTGCGGTCGTTTCTCCGACAT
 up16: CAAAAACGTTGACCCGAAATCCTTCAAACCTGGTTCAGAACA
 up17: AATACCTGGGTGTTATCATCCAGTGCCTGGTTACCGAAACC
 up18: AAAACCTCCGTTTCCCGTCACATCTACTTCTTCTCCGCTC
 up19: GTGGTCGTATCGACCCGCTGGTTTACCTGGACGAATTCC
 up20: TGCCTAACTCCGAACCGGTTCTGAAACGTGTTAACCGTAC
 up21: CGGTAACTCCTCCTCCAACAAACAGGAATACCAGCTGCTGA
 up22: AAGACAACCTGGTTTCGTTTCCTACAACAAAGCTCTGAAAAAAAC
 up23: GCTCCGTACTCCATCTTCGCTATCAAAAACGGTCCGAAA
 up24: TCCCACATCGGTGCTCACCTGATGACCTCCTTCTGTCC
 up25: ATGAAAGGTCTGACCGAACTGACCAACGTTGTTGGTAACTGG
 up26: TCCGACAAAACGTGCTTCCGCTGTTGCTCGTACCACCT
 up27: ACACCCACCAGATCACCGCTATCCCGGACCACTACTTCG
 up27a: CCACCCACCAGATCACCGCTATCCCGGACCACTACTTCG
 up28: CTCTGGTTTCCCGTTACTACGCTTACGACCCGATCTCCAAAG
 up29: AAATGATCGCTCTGAAAGACGAAACCAACCCGATCGAAGA
 up30: ATGGCAGCACATCGAACAGCTGAAAGGTTCCGCTGAAG
 up31: GTTCCATCCGTTACCCGGCTTGGAACGGTATCATCTCCC
 up32: AGGAAGTTCTGGACTACCTGTCCTCCTACATCAACCGTCGTATCTA
 low1: CCAGAACTTTTCGGCGGGGTTTTGCACAGGATGTGAA
 low2: CGGACGGACGTTTCGAAACGTTCAACGAACTGACGAA
 low3: CAGGTAGGTCAGTTCAGCAGCGCACAGAGCGATTTTTTTCAC
 low4: CGTTTGATAGCGGTACCGTTGTGGGTGATCATCCAGCA
 low5: ACAGGGAGTTGGAGATGATGGTGTGTAGGACATGAAGGTAGCA
 low6: TTTTGTATTTGAACTGCAGGGATTTGTTAACGATGTCCAGGG
 low7: CAGTTTTTTCAGGGAAGCTTCCAGGATGGTAGCTTTCTGGG
 low8: CGTAGTACGGGATGATGGTGAATTCCCAAGCCGGGAT
 low9: GAGGAAACGATGTCGGTGATGTCGGAAGTGGTGTCTGAC
 low10: GTCAGCTTCTTCGGAGGATTCGAACTGCAGCTGCAGG
 low11: CAGCAGAGCTTTTCAGCATTTTTTTGGAGTGGGAGTTACCTTT
 low12: GATTTTTTCGGTGATTTCCAGATGGATTCACCTTCGGA
 low13: TGGTTTTTGGTGAACCGGAGGTGTATTCCAAGGAGTTCAG
 low14: CAGTTGATGAAGGTAGCCAGGAACAGGAACTGGTACAGGGTTT
 low15: TTTCCGGTCAACGTTTTTTGATGTCGGAGAAACGACCG
 low16: TGGATGATAACCCAGGTATTTGTTCTGAACCAGTTTGAAGGA
 low17: ACGGGAACCGAGGTTTTTGGTTTTCGGTAACCAGGCAC
 low18: GCGGGTCGATACGACCACGAGCGGAGAAGAAGTAGATGTG
 low19: CGGTTCCGAGTTACGCAGGAATTCGTCCAGGTAAACCA

low20: TGTGGAGGAGGAGTTACCGGTACGGTTAACACGTTTCAGAAC
 low21: AGGAACGAACCAGGTTGTCTTTCAGCAGCTGGTATTCCTGTT
 low22: CGAAGATGGAGTACGGAGCGTTTTTTTTCAGAGCTTTGTTGT
 low23: GTGACGACCGATGTGGGATTTTCGACCGTTTTTGATAG
 low24: CAGTTCGGTCAGACCTTTCATGGACAGGAAGGAGGTCATCAG
 low25: GGAAGCACGTTTGTTCGGACCAGTTACCAACAACGTTGGT
 low26: CGGTGATCTGGTGGGTGTAGGTGGTACGAGCAACAGC
 low26a: CGGTGATCTGGTGGGTGGAGGTGGTACGAGCAACAGC
 low27: CGTAGTAACGGGAAACCAGAGCGAAGTAGTGGTCCGGGATAG
 low28: CGTCTTTCAGAGCGATCATTCTTTGGAGATCGGGTCGTAAG
 low29: CTGTTTCGATGTGCTGCCATTCTTCGATCGGGTTGGTTT
 low30: CCGGTAACGGATGGAACCTTCAGCGGAACCTTTCAG
 low31: GGACAGGTAGTCCAGAACTTCCTGGGAGATGATACCGTTCCAAG
 low32: AACGAGGATCCTTAGATACGACGGTTGATGTAGGA
 KF-FLP-BamHI: GTGGATCCATGCCGAGTTCGACATCCTG
 KR-FLP-SalI: GTGTCGACGATACGACGGTTGATGTAGGAG
 FLPSub2F: TTCGAAGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTCCATATG
 (auch 5'-*rhodamine green* markiert)
 FLPSub2R: CATATGGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCTTCGAA
 (auch 5'-*Cy5* markiert)
 TOP0-up: GATCCAAGCTAAAGTTATATAACTTTATTCAAGGTCGA
 (auch 5'-*rhodamine green* markiert)
 TOP0-low: TCGACCTTGAATAAAGTTATATAACTTTAGCTTGGATC
 (auch 5'-*Cy5* markiert)
 molecular beacon: Cy5-GCGACGTTCCATCCATGCCATGTCGC-Dabcyl
 QBI63F: AGCAGCCAACCTCAGCTTCC
 QBI63R: CCGGCGTAGAGGATCGAG
 Ev3FLP-1 ATGCCGGCCAGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGG
 (auch 5'-*Cy5* markiert, 5'-*rhodamine green* markiert bzw. intern an Pos. 26 *Cy5* markiert)
 Ev3FLP2 TGCCGGTACTGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCCTCCTTTCAGCAAAAAACCCCTCAAGACCC
 (auch intern an Pos. 50 *rhodamine green* markiert bzw. intern an Pos. 28 *TAMRA* markiert)
 Ev3FLP-3 GGATATCCGGATATAGTTCCTCCTTTCAGC
 (auch 5'-*Cy5* bzw. *rhodamine green* markiert)
 Ev4FLP1: GGGTTTTTTGCTGAAAGGAG
 Ev4FLP2: CAAAAAACCCCTCAAGACCC

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Petra Schulle bedanken, die mir in ihrer Biofuture-Gruppe am Max-Planck-Institut in Göttingen die Möglichkeit gab, die Biochemie mit dem spannenden Gebiet der Einzelmolekül-Techniken zu verbinden. Mein Dank gilt Petra auch für die Übernahme des Korreferats. Für die Übernahme der Betreuung danke ich Prof. Jürgen Alves aus Hannover, der von vornherein den neuen Techniken aufgeschlossen und interessiert gegenüberstand. Von den Mitgliedern der Biofuture Gruppe danke ich allen voran Dr. Guido Böse für die hervorragende biochemische Betreuung und für seinen besonderen Einsatz für unsere Gruppe, von dem ich sehr profitieren konnte. Durch Guidos Erfahrung und Wissen konnte manche Hürde, die auf dem Weg zum Gelingen dieser Arbeit zu überwinden war, leichter genommen werden!

Ein grosses Extra-Dankeschön geht natürlich an unsere technischen Assistentinnen Karin Birkenfeld und Sylvia Löbermann, die sowohl sich mit großem Interesse und Sachverstand speziellen biochemischen Experimenten gewidmet haben, als auch die ebenso wichtige Organisation sowie Ver- und Entsorgung des Labors übernommen haben. Ein spezieller Dank auch an Kirsten Bacia, die wichtig für meine ConfoCor2 Messungen war, da sie sich immer intensiv für die Betreuung des Gerätes eingesetzt hat. Tobias Kohl und Sally Kim hatten für meine biochemischen Fragestellungen immer ein offenes Ohr und gaben oftmals wertvolle Tipps – Danke dafür! Im Einzelnen danke ich auch Elke Haustein, Petra Dittrich, Dag Scherfeld, Stephan Schäfer und Dr. Katrin Heinze für alles, was ich von ihnen über Physik lernen konnte und für die Zusammenarbeit und das Interesse ihrerseits, was die Biochemie anbelangt. Ich danke Prof. Miguel Medina von der Universität Málaga für die Zusammenarbeit beim Topoisomerase II Projekt.

Mein Dank gilt selbstverständlich auch Herrn Prof. Manfred Eigen, Dr. Ruthild Winkler-Oswatitsch und den ehemaligen, seit einiger Zeit mit der DIREVO Biotech AG selbständigen Kollegen Dr. Ulrich Kettling, Dr. Andre Koltermann und Dr. Jens Stephan, die mich zu Beginn der Arbeit für die evolutive Biotechnologie begeistert haben. Für Anregungen und Diskussionen auf diesem faszinierenden Gebiet danke ich auch Dr. Markus Rarbach, Dr. Thomas Greiner-Stöfle, Axel Rohde und Rene Kuhlemann. Holger Dunkel war stets hilfsbereit bei Computerproblemen, Danke dafür. Ebenfalls zu den „alten“ Kollegen gehören Dr. Thorsten Winkler und Dr. Jan Bieschke, denen ich für vielerlei Tipps rund um das erste ConfoCor danke. Dr. Susanne Brakmann gilt mein Dank für die stets prompten Oligosynthesen während ihrer Zeit in der Abteilung. Last but not least danke ich natürlich auch der „alten“ Ecklabor-Besatzung Melanie Wegstroth und Katrin Baumert für manche biochemische Hilfestellung, besonders während der Biofuture-Startphase.

Ich möchte es nicht versäumen, auch allen anderen, aktuelleren Mitarbeitern der Abteilung zu danken, vor allem Monika Meyer für die Unterstützung im Grafik- und Fotobereich sowie Martina Seebode für die Gläserspülung und beiden zusammen für ihr Aufräumen in der Küche, falls nach spätabendlichen Kochorgien am Morgen danach einmal nicht alles so ordentlich und sauber gewesen sein sollte, wie es hätte sein sollen! Ein Dank geht auch an etliche andere Abteilungen und Arbeitsgruppen innerhalb des Institutes für die freundliche Zusammenarbeit und Bereitstellung von Gerätekapazitäten, wobei hier aus Platzgründen nur einige aufgezählt werden können. Herrn Rüdiger Luce aus der Arbeitsgruppe um Prof. Christof Biebricher danke ich für die stets freundliche Überlassung von Geräten und Chemikalien, im Labor von Prof. Dietmar Pörschke konnte ich die Messungen zur dynamischen Lichtstreuung durchführen, in der Abteilung von Prof. Weber war die Mitbenutzung der FrenchPress und der FPLC-Anlage möglich, und die Feinmechanik fertigte manches wichtige Teil mit hoher Geschwindigkeit und Präzision. Meine wissenschaftliche Ausbildung ermöglicht haben meine Eltern, die mein Studium der Biochemie finanziell und ideell unterstützt haben, ohne jedoch Einfluss auf mein Studienfach genommen zu haben – ein großes Dankeschön dafür. Besonders bedanken möchte ich mich bei Jue für das Leben außerhalb des Labors und die Toleranz gegenüber den teilweise ungewöhnlichen Arbeitszeiten!

Curriculum vitae

Name:	Michael Jahnz
Geboren:	am 13. November 1972 in Bückeburg
Familienstand:	verheiratet
Werdegang:	
1979-1983	Grundschule Porta Westfalica - Hausberge
1983-1992	Städtisches Gymnasium Porta Westfalica
April 1992	Abitur
Juni 1992-August 1993	Zivildienst beim Deutschen Jugendherbergswerk
ab WS 93/94	Diplomstudiengang Biochemie an der Universität Hannover
SS 94	Vordiplom, Teil A
SS 95	Vordiplom, Teil B
SS 98	Diplomprüfung
Mai 1998 - Oktober 1998	Diplomarbeit am Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover mit dem Thema „Rekombinante Expression der Hüllproteine E ₀ und E ₂ des Virus der klassischen Schweinepest in Säugetier-Zellen zwecks Charakterisierung und Untersuchung auf Rezeptor bindende Eigenschaften“
April 1999 - März 2003	Anfertigung der Doktorarbeit bei Prof. Petra Schulle am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen